
SVILUPPO DI UN NUOVO METODO DI SCREENING GENETICO PER LA RICERCA DI MUTAZIONI NEI GENI BRCA1 E BRCA2 ASSOCIATI AL CARCINOMA DELLA MAMMELLA.

Mariangela Iorio

Dottorato in Scienze Biotechologiche – XXII ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II





**SVILUPPO DI UN NUOVO METODO DI
SCREENING GENETICO PER LA
RICERCA DI MUTAZIONI NEI GENI
BRCA1 E BRCA2 ASSOCIATI AL
CARCINOMA DELLA MAMMELLA.**

Mariangela Iorio

Dottoranda: Mariangela Iorio

Relatore: Prof. Francesco Salvatore

Coordinatore: Prof. Ettore Benedetti

INDICE

Riassunto	5
Summary	7
1 Introduzione.....	9
1.1. Epidemiologia.....	9
1.2. Hereditary Breast and Ovarian Cancer	9
1.3. BRCA1	10
1.4. BRCA2	13
1.5. Mutazioni su BRCA1 e BRCA2	14
1.6. Diagnosi molecolare di HBOC.....	15
1.7. Scopo della tesi.....	16
2 Materiali e Metodi	17
2.1. Soggetti di controllo.....	17
2.2. Pazienti	17
2.3. Tipologia campioni biologici	19
2.4. Strategia d'analisi.....	20
2.5. Estrazione del DNA	20
2.6. Costruzione dei primer di amplificazione.....	20
2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)	26
2.8. Elettroforesi su gel di agarosio	29
2.9. Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)	30
2.10. Sequenziamento diretto	39
3 Risultati.....	40
4 Discussione	49
5 Conclusioni e prospettive	51
6 Bibliografia.....	52
Appendice	58

Riassunto

I carcinomi della mammella e dell'ovaio rappresentano le prime cause di mortalità per tumore nel sesso femminile in tutto il mondo; in Italia ed in Europa sono diagnosticati ogni anno, rispettivamente, circa 38.000 e 430.000 nuovi casi di tumore della mammella. Il 90-95% di tutti i casi di carcinoma della mammella e dell'ovaio è da considerarsi di natura sporadica, il restante 5-10% è costituito da forme ereditarie a trasmissione autosomica dominante definite *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, HBOC. I geni che conferiscono il più elevato rischio di sviluppare questa sindrome tumorale ereditaria sono BRCA1 e BRCA2, identificati nei primi anni '90. I soggetti che presentano la forma HBOC si distinguono da quelli con il carcinoma di tipo sporadico, soprattutto per la giovane età di insorgenza della malattia e la presenza in famiglia di numerosi casi di carcinoma, non solo della mammella, ma anche dell'ovaio e/o di altri organi. Inoltre, per quanto riguarda il carcinoma della mammella, è possibile riscontrarlo, seppure raramente, anche in soggetti di sesso maschile. Nelle famiglie con mutazioni a carico di tali geni, il rischio cumulativo di sviluppare il carcinoma mammario e/o ovarico entro i 70 anni di età, è pari rispettivamente all'80% ed al 40-60%.

BRCA1 è un gene situato sul cromosoma 17, è composto da 24 esoni distribuiti su una regione genica di circa 100 kb e codifica una proteina di 1863 amminoacidi. BRCA2 si trova sul cromosoma 13, è costituito da 27 esoni che coprono una regione genica di circa 70 kb e produce una proteina di 3418 amminoacidi. Ad oggi, sono riportate più di 3000 differenti varianti di sequenza di BRCA1 e BRCA2 (patogeniche e non) distribuite uniformemente su tutta la lunghezza di entrambi i geni (BIC database). In particolare, le mutazioni più frequentemente associate ad aumentato rischio di sviluppare carcinoma della mammella sono costituite dalle mutazioni *frameshift* e da quelle *nonsense*, che causano la produzione di una proteina trunca e quindi non funzionale. In seguito alla scoperta, negli anni '90, di BRCA1 e BRCA2, la possibilità di identificare i soggetti che sono predisposti a sviluppare carcinomi della mammella e/o dell'ovaio ha portato all'implementazione di test molecolari per la rilevazione di mutazioni deleterie in BRCA1 e BRCA2 e la successiva consulenza genetica dei soggetti portatori di mutazione. Fino ad oggi, il sequenziamento diretto costituisce il metodo d'elezione per l'analisi completa dei due geni in questione, tuttavia esso risulta alquanto dispendioso sia in termini economici che di tempo e per questo motivo nel corso degli anni sono state utilizzate delle tecniche di indagine molecolare volte ad uno screening pre-sequenziamento. Tra le varie tecniche che sono state adottate, ricordiamo la *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), il *Protein Truncation Test* (PTT), la *Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis* (CSGE) e la *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC). La DHPLC risulta senza dubbio la migliore in termini di sensibilità e costi, per cui negli ultimi anni la DHPLC si è affermata come tecnica principale ai fini di screening molecolare di BRCA1 e BRCA2.

Presso i laboratori del CEINGE è stata messa a punto una metodica per l'identificazione di mutazioni in BRCA1 e BRCA2. Sono stati utilizzati, ai fini dell'ottimizzazione, 53 soggetti di controllo dell'archivio di Fibrosi Cistica del CEINGE di Napoli e 15 pazienti HBOC provenienti dall'Istituto Oncologico Giovanni Paolo II di Bari, che erano stati precedentemente sottoposti a screening per mutazioni in

BRCA1 e BRCA2. Dopo aver ottimizzato le condizioni per l'amplificazione di BRCA1 e BRCA2, i campioni di DNA, estratti da sangue periferico e appartenenti ai 53 soggetti di controllo di Napoli ed ai 15 soggetti HBOC di Bari, sono stati analizzati utilizzando la metodica combinata DHPLC/ nucleasi SURVEYOR®, che è basata sul metodo di *sizing* in condizioni non-denaturanti, piuttosto che sulle Temperature di Melting (T_m).

In pratica, gli ampliconi sono analizzati in DHPLC alla temperatura di 45°C, e sono visualizzati, se wild type, con un singolo picco o, in presenza di mutazioni, con multipli picchi corrispondenti all'amplicone wild type non digerito dall'enzima e ai frammenti di amplicone con eteroduplex che derivano dal taglio enzimatico. La metodologia combinata DHPLC/SURVEYOR® è stata ottimizzata prima su singoli ampliconi, poi è stato ideato un protocollo che consentisse di analizzare più ampliconi simultaneamente, secondo un approccio "multiamplicon". Tutti i campioni che hanno presentato cromatogrammi compatibili con la presenza di variazioni di sequenza sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto allo scopo di caratterizzare le varianti di sequenza identificate. In seguito all'analisi dei campioni che sono stati sequenziati, possiamo affermare che la metodica combinata DHPLC/SURVEYOR® si è rivelata estremamente sensibile, poiché è stata confermata la presenza di polimorfismi e mutazioni in tutti i campioni il cui cromatogramma risultava alterato. In particolare, sono state identificate nei soggetti di controllo 42 varianti geniche, 19 su BRCA1 e 23 su BRCA2, tra cui 26 polimorfismi, 10 *UnClassified Variants* (UCVs) e 6 nuove varianti, 3 introniche, una esonica, una in 5'UTR ed una in 3'UTR. Nei 15 pazienti HBOC di Bari sono state rilevate tutte le 10 varianti di sequenza che erano precedentemente state identificate presso il centro di Bari. Allo stato attuale, è in corso una fase di reclutamento di pazienti della regione Campania sia con diagnosi clinica di HBOC, sia con carcinoma della mammella di tipo sporadico, da utilizzare come controlli. Fondamentali si sono rivelate, in questa fase progettuale, le collaborazioni con l'Istituto Nazionale Tumori-Fondazione G. Pascale di Napoli ed il Dipartimento Universitario di Chirurgia Generale, Geriatrica, Oncologica e Tecnologie Avanzate della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università degli Studi di Napoli "Federico II". Per poter ottenere quante più informazioni possibili riguardo le pazienti reclutate, è stato creato un apposito questionario anamnestico, da sottoporre ai soggetti che daranno il consenso a partecipare a questo studio epidemiologico a scopo di ricerca. Le 10 pazienti reclutate finora sono già state sottoposte ad indagine molecolare per la ricerca di mutazioni in BRCA1 e BRCA2. In una di queste pazienti è stata identificata una mutazione deleteria, la p.K2013X, nota sia in letteratura che sul database BIC. La mutazione p.K2013X causa la creazione di un codone di stop, per cui ne risulta la produzione di una proteina tronca e non funzionale e la probabile soppressione di un sito di legame con la proteina Rad51, legame necessario per l'attività di ricombinazione omologa e riparazione dei danni al DNA.

Poiché, in base a dati di letteratura, sono state riscontrate mutazioni su BRCA1 e BRCA2 soltanto nel 20% di tutti i casi di HBOC, intendiamo approfondire gli studi molecolari sul carcinoma della mammella e dell'ovaio in particolare sui soggetti clinicamente affetti da HBOC che risulteranno negativi allo screening di BRCA1 e BRCA2, prendendo in considerazione anche altri tipi di target molecolare come ad esempio i microRNA ed il trascrittoma.

Summary

Breast and ovarian cancers are the leading causes of cancer mortality in women worldwide. In Italy, about 38,000 new cases are diagnosed each year, whereas the corresponding figure for Europe is 430,000. Ninety per cent of cases of breast and ovarian cancer are sporadic; the remaining 10% are hereditary forms known as "Hereditary Breast and Ovarian Cancers" (HBOCs). In the first decade of 1990 two oncosuppressor genes, BRCA1 and BRCA2, were identified as the most important breast cancer susceptibility genes in high-risk families. Women leading heterozygous mutations in BRCA1 or BRCA2 gene have up to an 80% risk of developing breast cancer by age 70 and 40-60% risk of developing ovarian cancer.

BRCA1 is located in the chromosome 17, has 22 exons, spans approximately 100kb of genomic DNA, and encodes a 1863 amino acid protein, while BRCA2, on chromosome 13, has 27 exons, spans around 70kb and encodes a protein of 3418 amino acids. Up to now, more than 3000 distinct BRCA1 and BRCA2 sequence variants were identified. Mutations mostly related to the pathogenesis of breast cancer are frameshift and nonsense mutations, causing the production of a truncated and non-functional protein. After the BRCA1 and BRCA2 identification, genetic testing represented an opportunity for a better clinical management of high-risk women. Because of the importance of the test result, great demands are made on the diagnostic accuracy. Direct sequencing is considered the "gold standard" for mutation detection, but time-consuming and costly, so there is a need to establish a faster and less expensive alternative method for BRCA1 and BRCA2 routine diagnostics with comparable accuracy. Several scanning methods are available for the detection of sequence alterations, such as the Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), the Protein Truncation Test (PTT), the Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE) and the Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). At present, only DHPLC can be considered to be used as a scanning test in a routine diagnostic setting, because of its high sensitivity (>95%) and the possibility to perform the analysis easily and quickly. This technique is automated and enables high-throughput analyses.

At CEINGE laboratories, a new method for BRCA1 and BRCA2 mutation detection was set up. 53 control subjects from Cystic Fibrosis sample bank of CEINGE and 15 HBOC patients, previously screened for BRCA1 and BRCA2 at National Cancer Institute "Giovanni Paolo II" of Bari, were used for the optimization of this new method.

After optimizing the conditions for BRCA1 and BRCA2 amplification by PCR, the molecular BRCA1 and BRCA2 screening was performed on the DNA samples by combined DHPLC/SURVEYOR® Nuclease approach, based on sizing application in non-denaturing conditions, rather than the classical approach with Melting Temperatures (T_m). After cleavage by SURVEYOR® Nuclease, a new specific endonuclease that cleaves heteroduplex DNA at a base-mismatch site in both DNA strands, gene variants were simply detected by DHPLC WAVE Nucleic Acid High Sensitivity Fragment Analysis System (Transgenomic) followed by sequencing of altered amplicons. At first, this method was tested for single amplicons, then optimized for a "multiamplicon" analysis. All the gene variants identified by DHPLC/SURVEYOR® strategy were confirmed by direct sequencing.

The DHPLC/SURVEYOR® strategy with multiamplicon approach revealed a high sensitivity, greater than the T_m based method. In particular, 42 gene variants were identified in the control subjects, 19 in BRCA1 and 23 in BRCA2, among which 26 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), 10 Unclassified Variants (UCVs) and 6 new variants. About the 15 HBOC patients from Bari, we were able to identify all the BRCA1 and BRCA2 variants previously detected at Bari research centre.

Actually, we are recruiting either HBOC patients or sporadic breast cancer cases, as controls for our future studies, thanks to the scientific collaboration with the National Cancer Institute “G. Pascale” of Naples and the Department of General, Geriatric, and Oncological Surgery and of Advanced Technologies of the Faculty of Medicine and Surgery-University of Naples “Federico II”.

To collect the medical history of each patient, we created a specific questionnaire, including also the informed consent for research studies. All the 10 patients were screened for BRCA1 and BRCA2 mutations. One of them was heterozygous for the deleterious mutation p. K2013X and homozygous for the high-risk polymorphism p.P871L.

However, BRCA1 and BRCA2 mutations have been identified in only 20% of all HBOC cases analyzed. This reinforces the hypothesis that there are mutations involving other genes. In the attempt to solve this discrepancy, we plan to carry out a complete molecular analysis, mainly on the BRCA-negative HBOC patients, focusing our future research on new molecular targets, such as microRNAs and transcriptome which will be extracted from tumour tissues.

1 Introduzione

1.1. Epidemiologia

I carcinomi della mammella e dell'ovaio rappresentano le prime cause di mortalità per tumore nel sesso femminile in tutto il mondo; in Italia ed in Europa sono diagnosticati ogni anno, rispettivamente, circa 38.000 e 430.000 nuovi casi di tumore della mammella^{1, 2}.

La maggior parte dei casi di carcinoma della mammella e dell'ovaio (90-95%) è da considerarsi di natura sporadica, e risulta associata ad un insieme di fattori di rischio di tipo ambientale, comprese le abitudini alimentari^{3, 4}. Il restante 5-10% è costituito da forme ereditarie a trasmissione autosomica dominante definite *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, HBOC^{5, 6}.

1.2. Hereditary Breast and Ovarian Cancer

Nei primi anni '90, in seguito ad analisi di linkage in famiglie che presentavano numerosi casi di carcinoma della mammella e/o dell'ovaio insorti in età giovanile, sono stati identificati due geni con ruolo oncosoppressore, *Breast Cancer 1* e *Breast Cancer 2* (BRCA1 e BRCA2), risultati poi strettamente coinvolti nella predisposizione ai carcinomi ereditari della mammella e dell'ovaio.^{7, 8}

Per identificare i soggetti a rischio di sviluppare carcinomi della mammella/ovaio sono state formulate delle precise linee guida, basate sull'analisi anamnestica familiare.^{9, 10, 11} In particolare i soggetti che presentano la forma HBOC si distinguono da quelli con il carcinoma di tipo sporadico, soprattutto per la giovane età di insorgenza della malattia e la presenza in famiglia di numerosi casi di carcinoma, non solo della mammella, ma anche dell'ovaio e/o di altri organi. Inoltre, per quanto riguarda il carcinoma della mammella, è possibile riscontrarlo, seppure raramente, anche in soggetti di sesso maschile.^{12, 13}

Attualmente, i geni che conferiscono il più elevato rischio di sviluppare questa sindrome tumorale ereditaria sono BRCA1 e BRCA2. Infatti è noto che, nelle famiglie con mutazioni a carico di tali geni, il rischio cumulativo di sviluppare il carcinoma mammario e/o ovarico entro i 70 anni di età, sia pari rispettivamente all'80% ed al 40-60%.¹⁴ Inoltre i portatori di mutazioni del gene BRCA1 presentano un aumentato rischio di insorgenza di tumori al pancreas, all'endometrio, alla cervice uterina ed alla prostata.^{15, 16}

Nonostante BRCA1 e BRCA2 siano i geni maggiormente coinvolti nella predisposizione ai carcinomi della mammella e dell'ovaio, mutazioni in uno dei due geni sono state riscontrate soltanto nel 20% circa di tutti i casi di carcinoma ereditario della mammella e dell'ovaio.¹⁷ Al fine di valutare nel modo più completo possibile il rischio di sviluppare HBOC, negli ultimi anni sono stati condotti studi molecolari

anche per valutare il ruolo sia dei polimorfismi (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) di BRCA1 e BRCA2^{9, 18} sia delle mutazioni e SNPs di altri geni probabilmente coinvolti, proprio come BRCA1 e BRCA2, nei processi di riparo dei danni al DNA e regolazione del ciclo cellulare nonché dell'apoptosi.^{19, 20, 21}

In particolare, è stata identificata l'associazione di alcuni geni, quali CHEK2, BRIP1 e PALB2 ad un aumento del rischio, seppur modesto, di sviluppare carcinoma della mammella.^{22, 23, 24} Al contrario, è stato identificato un SNP nel gene CASP8 che risulta avere un effetto "protettivo", per cui il rischio di sviluppare HBOC è inferiore nei soggetti portatori di tale polimorfismo rispetto ai soggetti wild type.^{25, 26}

Negli ultimi tempi, inoltre, sta crescendo sempre più l'interesse nei confronti dei microRNA come molecole coinvolte nei processi di tumorigenesi.^{27, 28, 29}

I microRNA sono delle piccole molecole di RNA endogeno non codificante, lunghe circa 18-25 nucleotidi. È stato dimostrato il loro coinvolgimento nella regolazione dell'espressione genica e la conseguente alterazione di tale regolazione in molte patologie, tra cui i carcinomi della mammella.^{30, 31, 32, 33} Tuttavia, studi riguardanti l'associazione tra i microRNA ed il rischio di sviluppare HBOC ancora non sono stati effettuati.

1.3. BRCA1

BRCA1 è un gene situato sul cromosoma 17, è composto da 24 esoni distribuiti su una regione genica di circa 100 kb e codifica una proteina di 1863 amminoacidi.⁷

Tale proteina è costituita da una regione N-terminale di circa 100 amminoacidi, caratterizzata dalla presenza di un *RING-domain*. Questo tipo di dominio *zinc finger* possiede attività ubiquitina-ligasica ed è caratteristico di varie proteine coinvolte nei meccanismi di riparo dei danni al DNA.^{34, 35, 36}

BRCA1 forma, a livello di questo dominio, un eterodimero con un'altra proteina, BARD1, che contiene a sua volta un RING-domain (Figura 1a). Il dominio centrale di BRCA1 (Figura 1b), composto da circa 600 amminoacidi, rappresenta un sito di legame per un macrocomplesso proteico, definito *BRCA1-Associated genome Surveillance Complex* (BASC), che comprende numerose proteine, tra cui le più importanti sono RAD50, MRE11 e NBS1 note per il loro ruolo nel metabolismo e riparo dei danni al DNA.^{37, 38}

Il dominio C-terminale di BRCA1 (Figura 1c) è caratterizzato dalla presenza di due domini BRCT (*BRCA1 C-Terminus*) costituiti ciascuno da circa 85-95 amminoacidi, per lo più idrofobici, organizzati in gruppi ripetuti.³⁹

A questo dominio è riconosciuto il legame di varie proteine, tra cui BRCA2, RHA (RNA elicasi A), RNA polimerasi II, p53, HDAC (Istone Deacetilasi).^{39, 40, 41}

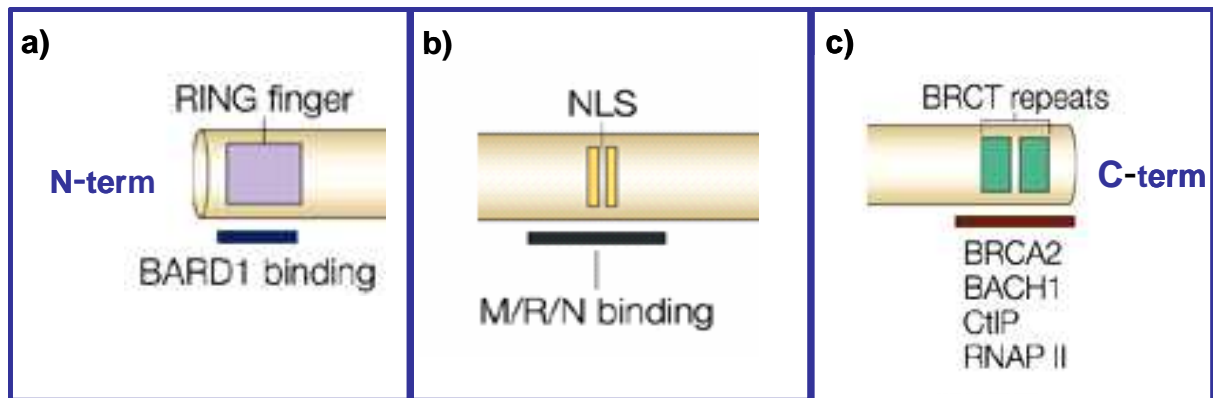


Figura 1. a) BRCA1, dominio N-terminale; b) BRCA1, dominio centrale; c) BRCA1 dominio C-terminale. M= Mre11; R= RAD50; N= NBS1

Ad oggi, sono state associate a BRCA1 molteplici funzioni, soprattutto nell'ambito dei processi nucleari di trascrizione, rimodellamento della cromatina e riparo dei danni al DNA. La funzione di BRCA1 di regolatore della trascrizione è stata stabilita successivamente all'evidenza che a BRCA1 si legava la RNA polimerasi II, costituendo il complesso proteico definito "RNA polimerasi II oloenzima".⁴² La costituzione di tale complesso proteico avviene mediante il legame con la proteina BARD1 all'estremità N-terminale di BRCA1, e con la RNA elicasi A all'estremità C-terminale, entrambe proteine che fanno parte dell'oloenzima e che fungono da "ponte" molecolare (Figura 2).

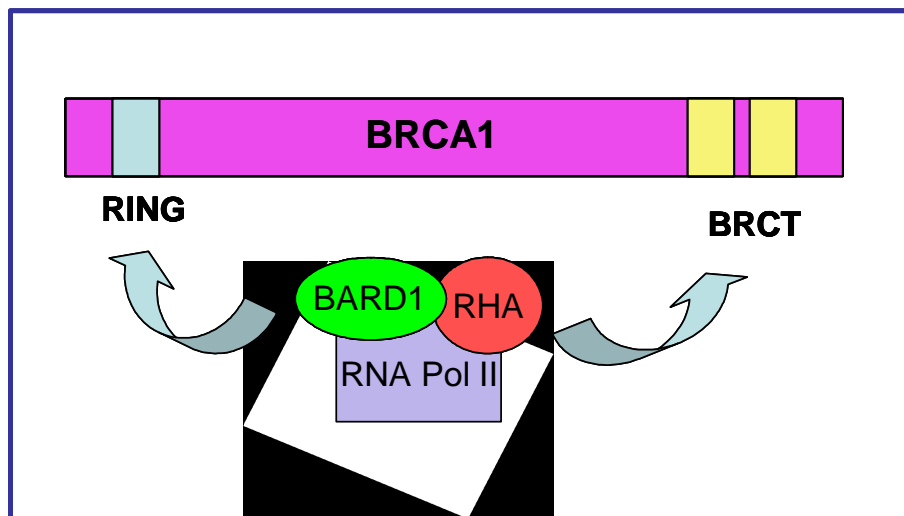


Figura 2. Interattori di BRCA1 nei meccanismi di regolazione della trascrizione.

L'associazione BARD1/BRCA1, inoltre, stimola l'attività di legame di BRCA1 al DNA, nonostante BARD1 non sia direttamente coinvolto in tale legame.⁴³ Un'altra funzione di BRCA1, mediata ancora da BARD1 mediante legame sul RING-domain, è quella di ubiquitina ligasi. È stato ipotizzato che questa attività di BRCA1 possa essere correlata non solo ai meccanismi di degradazione proteica, ma anche a meccanismi di attivazione della trascrizione ubiquitina-mediati.⁴⁴

Il ruolo di BRCA1 nel riconoscimento e riparazione dei danni al DNA è espletato mediante l'interazione, a livello del suo dominio centrale, con il complesso BASC ed in particolare con RAD50, MRE11 e NBS1, e mediante l'interazione con il complesso BRCA2/RAD51 a livello C-terminale (Figura 3).

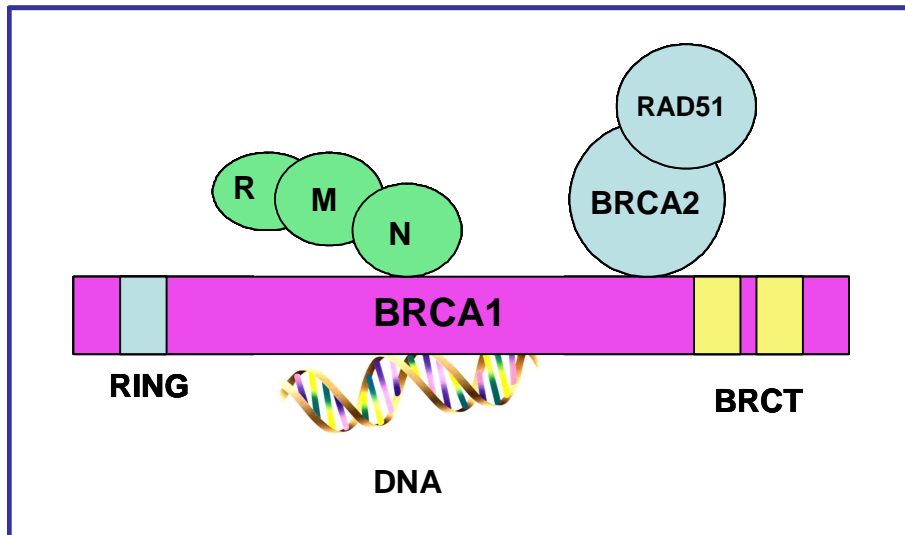


Figura 3. Partners di BRCA1 nei meccanismi di riparo del DNA.
M= Mre11; R= RAD50; N= NBS1

Tenendo conto delle varie funzioni attribuite a BRCA1, è stato ipotizzato uno specifico meccanismo di attivazione/azione di questo gene (Figura 4).

In particolare, il complesso BRCA1-BARD1, una volta riconosciuto un danno del DNA (step I), attiva la propria funzione di ubiquitina-ligasi con consecutiva degradazione di parte dell'oloenzima cui è legato (step II), stimolando il legame di BRCA1 al DNA (step III), il reclutamento di varie proteine (step IV) e la riparazione del danno al DNA (step V).

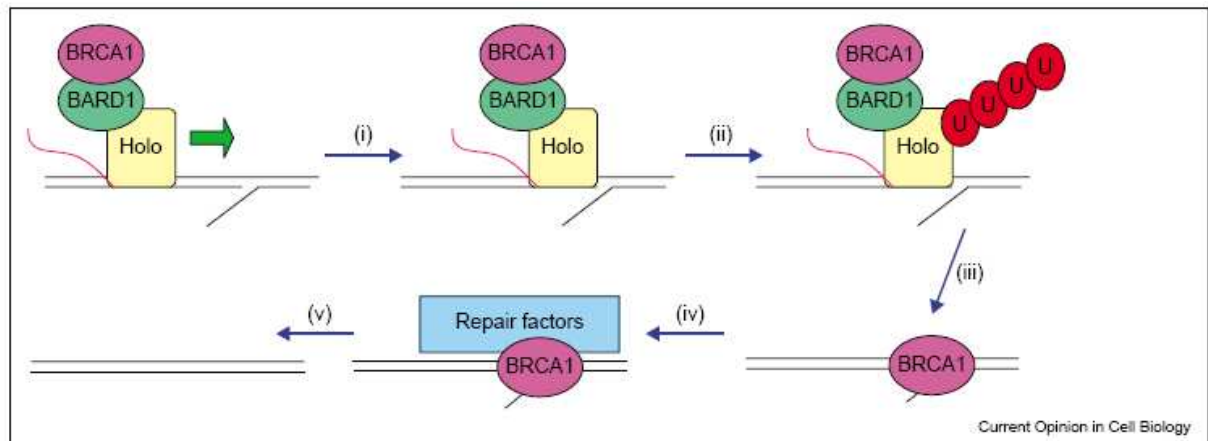


Figura 4. Funzioni di BRCA1 proposte in un unico meccanismo d'azione multi-step.⁴⁵

1.4. BRCA2

BRCA2 è un gene costituito da 27 esoni che coprono una regione genica di circa 70 kb e produce una proteina di 3418 amminoacidi.⁴⁶

Rispetto a BRCA1, noto per le sue molteplici funzioni, BRCA2 è conosciuto per lo più per la funzione di riparo dei danni al DNA per ricombinazione omologa.⁴⁷

Sono noti in BRCA2 un dominio di attivazione trascrizionale alla sua estremità N-terminale⁴⁸ ed un dominio centrale definito "BRC" (Figura 5). Questo dominio, fondamentale per il ruolo di BRCA2 nei pathways di riparazione dei danni al DNA, risulta costituito da otto motivi ognuno di circa 30 amminoacidi, altamente conservati.^{49, 50} La riparazione dei danni al DNA mediata da BRCA2 avviene grazie al legame tra BRCA2 e la proteina Rad51.⁵¹ E' stato provato che tale legame avviene a livello del dominio BRC.⁵¹

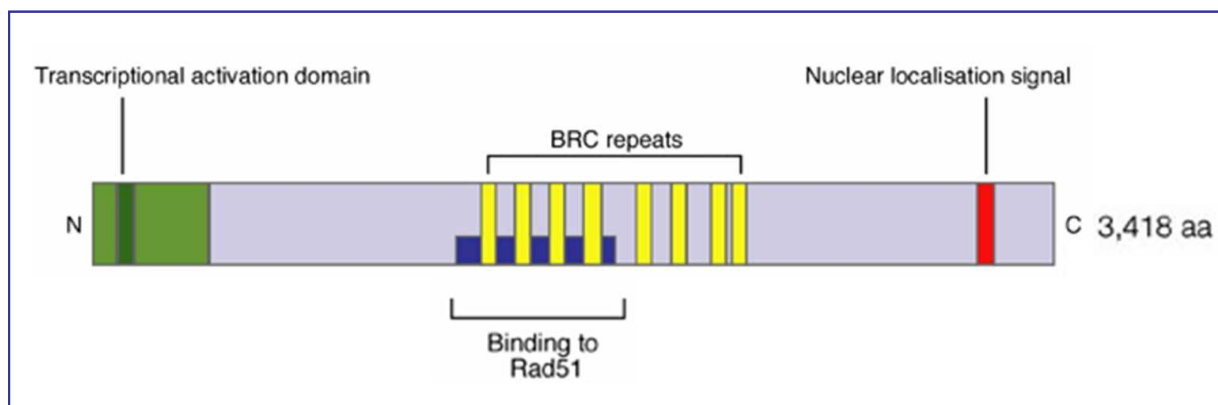


Figura 5. Domini funzionali di BRCA2.

Negli ultimi anni, in seguito a studi funzionali su BRCA2, è stata identificata un'altra proteina, PALB2, che interagisce con BRCA2 e partecipa ai meccanismi di attivazione della riparazione ai danni del DNA.^{52, 53} In particolare, è stato riconosciuto che il dominio C-terminale di PALB2 costituisce un sito di legame per il gruppo di amminoacidi 10-40 dell'N-terminale di BRCA2⁵³ e che il dominio N-terminale di PALB2 è responsabile del legame con BRCA1, facendo quindi da ponte tra BRCA1 e BRCA2.^{54, 55}

1.5. Mutazioni su BRCA1 e BRCA2

Ad oggi, sono riportate più di 3000 differenti varianti di sequenza di BRCA1 e BRCA2 (patogeniche e non) distribuite uniformemente su tutta la lunghezza di entrambi i geni (BIC database⁵⁶). In particolare, le mutazioni più frequentemente associate ad aumentato rischio di sviluppare carcinoma della mammella sono costituite dalle mutazioni *frameshift* e da quelle *nonsense*, che causano la produzione di una proteina, che sia BRCA1 o BRCA2, tronca e quindi non funzionale. Inoltre, risulta frequente in BRCA1 e BRCA2 la presenza di sostituzioni amminoacidiche definite "varianti non classificate" (*UnClassified Variants*, UCVs) poiché non è noto se queste varianti possano influenzare la funzione di entrambi i geni, a tal punto da essere delle varianti di rilevante significato clinico.⁵⁷

La frequenza delle mutazioni identificate in BRCA1 e BRCA2 varia considerevolmente in base all'area geografica e alla popolazione etnica.⁵⁸

In seguito a vari studi epidemiologici, sono infatti state correlate alcune mutazioni in BRCA1 e BRCA2 a specifiche popolazioni, come ad esempio le mutazioni c.185delAG e c.538insC in BRCA1 e la c.6174delT in BRCA2, frequenti soprattutto negli ebrei Ashkenazi. Anche in alcune regioni italiane sono state identificate mutazioni più ricorrenti rispetto ad altre, tali da essere definite mutazioni "con effetto fondatore".^{59, 60}

1.6. Diagnosi molecolare di HBOC

In seguito alla scoperta, negli anni '90, dei geni BRCA1 e BRCA2, la possibilità di identificare i soggetti che sono predisposti a sviluppare carcinomi della mammella e/o dell'ovaio ha portato all'implementazione di test molecolari per la rilevazione di mutazioni deleterie in BRCA1 e BRCA2 e la successiva consulenza genetica dei soggetti portatori di mutazione.

La complessità genomica che caratterizza BRCA1 e BRCA2, cioè le grosse dimensioni di entrambi i geni, l'assenza di *hot spot* di mutazione, la presenza di UCVs e la diversa distribuzione delle mutazioni in base alle aree geografiche/etnie, rende particolarmente delicata la fase di analisi molecolare di BRCA1 e BRCA2. Infatti, risulta di fondamentale importanza basarsi sull'utilizzo, ai fini di una corretta diagnosi molecolare, di metodiche analitiche che siano il più possibile sensibili e specifiche. Fino ad oggi, il sequenziamento diretto col metodo di Sanger costituisce il metodo d'elezione per l'analisi completa dei due geni in questione, tuttavia esso risulta alquanto dispendioso sia in termini economici che di tempo.

Nel corso degli anni sono state utilizzate delle tecniche di indagine molecolare volte ad uno screening pre-sequenziamento, in grado comunque di rilevare tutti i tipi di mutazione di BRCA1 e BRCA2, quali sostituzioni di singolo nucleotide, microdelezioni, microinserzioni e grossi riarrangiamenti genici.

Tra le varie tecniche che sono state adottate, si ricordano la *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), il *Protein Truncation Test* (PTT),^{61, 62} la *Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis* (CSGE)^{63, 64} e la *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* (DHPLC),^{9, 62} in grado di identificare le sostituzioni di singoli nucleotidi, le microdelezioni e le microinserzioni, che costituiscono più del 90% delle mutazioni riscontrate su BRCA1 e BRCA2. Per identificare i grossi riarrangiamenti genici (macrodelezioni-macroinserzioni), è stata adottata, ed è tuttora in uso, la tecnica della *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).^{65, 66}

Riguardo le metodiche volte all'identificazione delle mutazioni puntiformi e delle piccole delezioni-inserzioni, queste sono state confrontate tra loro, e ne è emerso che la DHPLC risulta senza dubbio la migliore in termini di sensibilità e costi,^{67, 68, 69} motivo per cui negli ultimi anni la DHPLC si è affermata come tecnica principale ai fini di screening molecolare di BRCA1 e BRCA2.

1.7. Scopo della tesi

L'analisi molecolare dei geni BRCA1 e BRCA2, quelli ad oggi maggiormente coinvolti nella predisposizione ai carcinomi della mammella e/o dell'ovaio, consentirebbe di individuare precocemente i soggetti a rischio e di attuare dei programmi di sorveglianza clinica *ad hoc*, per cui lo scopo di questa tesi è consistito nello sviluppo di una metodica di analisi molecolare dei geni BRCA1 e BRCA2, caratterizzata da estrema sensibilità (>95%) e rapidità, oltre ad essere economicamente conveniente.

La messa a punto di tale metodica è stata effettuata su soggetti di controllo, per poi essere validata su soggetti con HBOC reclutati nell'ambito del sud-Italia, nei quali la presenza di una mutazione in BRCA1 o BRCA2 era stata precedentemente identificata presso altro centro. Successivamente siamo passati allo screening di pazienti con carcinoma della mammella, sia ereditario che sporadico, non precedentemente analizzate.

2 Materiali e Metodi

2.1. Soggetti di controllo

L'ottimizzazione della metodica per analizzare BRCA1 e BRCA2 è stata effettuata utilizzando 53 campioni di DNA genomico, selezionati dall'archivio di Fibrosi Cistica presso il CEINGE di Napoli, appartenenti a soggetti di sesso femminile, risultati sani per tale patologia, dopo aver ottenuto il consenso informato all'utilizzo del proprio campione per fini di ricerca scientifica.

2.2. Pazienti


L'iter sperimentale ottimizzato su soggetti di controllo è stato validato su 15 campioni di DNA genomico appartenenti a soggetti clinicamente affetti da HBOC, reclutati presso l'Istituto Oncologico Giovanni Paolo II di Bari con cui il nostro istituto è in collaborazione, risultati positivi allo screening di mutazioni per BRCA1 o BRCA2, che sono state analizzate in cieco presso il nostro laboratorio, per validare l'affidabilità diagnostica della tecnica da noi messa a punto.

Tuttora in corso è una fase di reclutamento, nell'ambito della regione Campania, sia di pazienti con carcinoma della mammella ereditario, sia di soggetti di controllo affetti da carcinoma della mammella di tipo sporadico. Fondamentali, in questa fase progettuale, si sono rivelate le collaborazioni con l'Istituto Nazionale Tumori-Fondazione G. Pascale di Napoli ed il Dipartimento Universitario di Chirurgia Generale, Geriatrica, Oncologica e Tecnologie Avanzate della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università degli Studi di Napoli "Federico II". Il primo passo di questa fase del progetto è consistito in un'accurata ricerca bibliografica riguardante i criteri di selezione di una popolazione positiva per HBOC.^{9, 10, 11}

Tali criteri si basano per lo più sulla numerosità dei casi di cancro (≥ 3 casi) della mammella e/o dell'ovaio in famiglia, sulla presenza in famiglia di più tipi di carcinoma oltre a quello della mammella (ad esempio colon, pancreas, etc) e sull'età di insorgenza della malattia (≤ 40 anni) e sono stati utilizzati per la stesura di un questionario anamnestico, da sottoporre ai soggetti che daranno il consenso a partecipare a questo studio epidemiologico a scopo di ricerca (Figura 6).

In particolare sono state identificate quattro categorie di pazienti che si intende reclutare nel presente studio:

1. donne con tumore della mammella familiare (HBOC);
2. donne che hanno sviluppato il tumore della mammella in giovane età (*under 40*), indipendentemente dalla familiarità;
3. donne con tumore della mammella localmente avanzato o *Local Advanced Breast Cancer* (LABC), indipendentemente dalla familiarità;
4. donne con carcinoma mammario di tipo sporadico, che fungeranno da controllo.




Area Funzionale Biologia Molecolare Clinica

Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio

&

CEINGE - Biotecnologie Avanzate
 Centro di riferimento Regione Campania per la
 Biologia Molecolare Clinica e
 la Diagnostica di Malattie Congenite del Metabolismo



DATI ANAGRAFICI

Cognome: _____

Nome: _____

Data di nascita: ____/____/____ ☐ M ☐ F

Sigla id.: _____

TIPOLOGIA DI CAMPIONE

☐ Sangue periferico fresco prelevato il: ____/____/____
(n°2 provette in EDTA)

☐ Sangue periferico fresco prelevato il: ____/____/____
(n°1 provetta per raccolta di siero)

☐ Campione biotipo microistologico prelevato il: ____/____/____

☐ Tessuto tumorale n° prelievi: _____
☐ Tessuto sano n° prelievi: _____

☐ Campione biotipo chirurgico prelevato il: ____/____/____

☐ Tessuto tumorale n° prelievi: _____
☐ Tessuto sano n° prelievi: _____

NOTIZIE CLINICHE E INDAGINI STRUMENTALI

☐ Under-forty

☐ Carcinoma mammario

☐ LABC (Local Advanced Breast Cancer)

☐ Non neoplastico

☐ Familiarità

MARCATORI TUMORALI TESTATI:

____ CEA ☐ Pos ☐ Neg

____ 15-3 ☐ Pos ☐ Neg

DATI NOSOGRAFICI

Medico richiedente: _____

Ospedale: _____

Reparto/Ambulatorio: _____

Telefono: _____ FAX: _____

firma del medico richiedente: _____ *

*Con la mia firma attesto che il/i campione/i biologico/i identificato/i con la sigla _____ corrisponde/ono al/i campione/i del soggetto per il quale è stata inoltrata la richiesta di indagine.

INDAGINE(I) RICHIESTA(E)

Predisposizione ai carcinomi della mammella e dell'ovaio (analisi da sangue periferico):

☐ ricerca di mutazione NON NOTA nel gene BRCA1

☐ ricerca di mutazione NON NOTA nel gene BRCA2

☐ ricerca di mutazione già NOTA nella famiglia

ANAMNESI PERSONALE E FAMILIARE

FATTORI DI RISCHIO:

Età menarca: _____

☐ Gravidanze Se si indicare il n°: _____

☐ Uso di contraccettivi orali

☐ Fumo di sigaretta

Familiari affetti da carcinoma:

☐ Sì:

☐ Carcinoma della mammella
☐ Carcinoma dell'ovaio
☐ Altro

(indicare quanti ed il grado di parentela: _____)

☐ No

Familiari deceduti per carcinomi:

☐ Sì:

☐ Carcinoma della mammella
☐ Carcinoma dell'ovaio
☐ Altro

(indicare quanti ed il grado di parentela: _____)

☐ No

Nota: Indicare nel pedigree i tipi di carcinoma dei familiari affetti e/o deceduti.

CONSENSO INFORMATO

Pazienti in regime di ricovero

Attesto che il paziente di cui alla presente richiesta ha dato il proprio consenso a che il suo campione biologico ed i dati ad esso relativi dopo l'indagine diagnostica possano essere utilizzati in forma anonima per scopi di ricerca e/o di casistica epidemiologica

firma del medico che ha raccolto il consenso

Pazienti privati convenzionati e non

Il/La sottoscritto/a, previamente informato, dà il proprio consenso a che dopo l'indagine diagnostica, il suo campione biologico e i dati ad esso relativi possano essere utilizzati in forma anonima per scopi di ricerca e/o di casistica epidemiologica secondo quanto consentito dalle normative vigenti anche in materia di tutela della privacy.

firma del paziente o esercente patria potestà

1/2

I campioni potranno essere inviati dal lunedì al venerdì dalle ore 9 alle 13 al CEINGE, laboratorio n.8. Per Informazioni telefonare al 081/3737855 (Dott.ssa Iorio)

Tutti i dati riportati nel presente modulo saranno trattati secondo la normativa vigente in materia di tutela della privacy

Figura 6. Scheda anamnestica per reclutamento pazienti positive per HBOC.

2.3. Tipologia campioni biologici

Per ognuno dei soggetti di controllo dell'archivio Fibrosi Cistica del CEINGE di Napoli e per le 15 pazienti con HBOC reclutate presso l'Istituto Oncologico Giovanni Paolo II di Bari è stata utilizzata una provetta con EDTA contenente almeno 5 ml di sangue periferico, da cui è stato estratto il DNA. Riguardo i soggetti che sono attualmente in fase di reclutamento, è previsto il prelievo da ciascuno di essi di due provette (almeno 5 ml) di sangue periferico in EDTA, per poter estrarre il DNA e l'RNA; un campione di siero ed un campione di tessuto tumorale e controparte sana, per poter estrarre rispettivamente i microRNA circolanti ed i microRNA tissutali e l'mRNA, oggetto di futuri studi scientifici. I campioni di tessuto sono custoditi criopreservati in azoto liquido presso la Banca dei campioni biologici del CEINGE di Napoli, previo consenso informato delle pazienti (Figura 7).


		BANCA CAMPIONI BIOLOGICI – COLTURE CELLULARI	
		CONSENSO INFORMATO MOD. BCB 01	
Banca Campioni Biologici – Colture Cellulari Via Comunale Margherita 482 – 80 145 Napoli Tel: 081 3737873 e-mail: fortunat@unina.it; dinoto@dbbm.unina.it			
Compilare, Firmare ed Allegare al Campione Biologico			
Il sottoscritto/a			
Nato/a il/...../.....			
Residente in			
Provincia CAP			
Via n°			
Telefono			
Dopo essere stato/a informato/a che:			
<input type="checkbox"/> Il campione biologico prelevato potrà essere conservato presso la Banca Campioni Biologici del CEINGE;			
<input type="checkbox"/> Il campione biologico potrà essere utilizzato per indagini a scopo di ricerca e mai a fini di lucro;			
<input type="checkbox"/> Saranno garantiti l'anonimato nonché la riservatezza sulla provenienza del materiale biologico e sulle relative indagini;			
<input type="checkbox"/> La Banca adotterà tutte le procedure atte a garantire l'idoneità del campione, ma non si riterrà responsabile per eventuali danni o perdite che potranno verificarsi durante la manipolazione del campione biologico stesso;			
<input type="checkbox"/> In qualsiasi momento potrà comunicare alla Banca eventuali cambiamenti di opinione in merito a quanto dichiarato; a seguito di tale comunicazione, la Banca eliminerà il campione in oggetto nonché i relativi dati.			
Dichiara di:			
1) <input type="checkbox"/> Autorizzare <input type="checkbox"/> Non Autorizzare			
La conservazione del suddetto campione biologico appartenente a:			
<input type="checkbox"/> se stesso o <input type="checkbox"/> nome di cui il/la sottoscritto/a è			
2) <input type="checkbox"/> Autorizzare <input type="checkbox"/> Non Autorizzare			
L'utilizzo del suddetto materiale biologico a scopo di ricerca			
3) <input type="checkbox"/> Volere <input type="checkbox"/> Non Volere			
Essere informato dei risultati che derivano dagli studi di ricerca.			
Data		Firma	
Sanitario che ha raccolto il consenso informato:			
Nome:			
Cognome:			
Reperto:			
Istituto:			
Telefono: Fax:			
E-mail:			
Il sottoscritto/a Responsabile della Banca garantisce il rispetto delle citate dichiarazioni:			
Data		Firma	

Figura 7. Modulo del consenso informato della Banca dei campioni biologici del CEINGE.

2.4. Strategia d'analisi

La metodica d'analisi molecolare di BRCA1 e BRCA2 ottimizzata prevede le seguenti fasi analitiche:

- Estrazione del DNA da sangue periferico;
- Amplificazione dei geni BRCA1 e BRCA2 mediante Polymerase Chain Reaction (PCR);
- Analisi dei prodotti amplificati mediante Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)/ SURVEYOR®;
- Analisi diretta della sequenza nucleotidica con il metodo di Sanger modificato.

2.5. Estrazione del DNA

Il DNA genomico viene estratto a partire da 5 mL di sangue periferico utilizzando il kit "Nucleon BACC2" (GE Healthcare- Piscataway, NJ, USA).

Ad una prima fase di lisi cellulare seguono una fase di deproteinizzazione ed una di precipitazione del DNA in etanolo assoluto. Il DNA così estratto viene quindi sospeso in circa 200 µl di acqua sterile e quantizzato mediante lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm. La qualità dell'estratto viene valutata calcolando il rapporto fra la lettura a 260 nm e quella a 280 nm; il rapporto tra i valori dell'assorbanza a 260 nm e 280 nm di 1,8-2,0 è indice di elevato grado di purezza del DNA rispetto alle proteine.

I campioni di DNA genomico, una volta quantizzati, vengono diluiti ad una concentrazione di lavoro di 10 ng/µl e 50 ng/µl.

2.6. Costruzione dei primer di amplificazione

Questa fase del progetto ha avuto inizio con lo studio delle sequenze genomiche di riferimento dei geni BRCA1 e BRCA2 (rispettivamente L78833 e NM_000059 su <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e con l'annotazione delle mutazioni nelle regioni codificanti e nelle giunzioni esone-introne riscontrate in precedenza nella popolazione italiana in questi due geni. L'annotazione delle suddette mutazioni ha permesso non solo di identificare in linea generale le regioni geniche più frequentemente mutate nella popolazione italiana, ma anche di delimitare le regioni "off-limit", quelle cioè che non possono essere utilizzate come sito di attacco dei primer. Nello step successivo si è proceduto alla costruzione dei primer di PCR con l'ausilio del software Primer 3. Per la scelta dei primer di BRCA1 e BRCA2 sono stati rispettati i seguenti criteri:

1. Nessuno dei primer è complementare a tratti in cui siano presenti mutazioni;

2. Tutti i primer hanno temperature di appaiamento (“annealing”) simili, in modo da ridurre al minimo il numero di programmi di amplificazione;
3. Le coppie di primer forward-reverse hanno il minimo della complementarietà tra di loro, per evitare la formazione di dimeri di primer;
4. La lunghezza del prodotto di amplificazione non supera le 600 bp.

Il momento più complesso di tale fase è stata la costruzione dei primer per l'amplificazione dell'esone 11 sia di BRCA1 che di BRCA2. L'estrema lunghezza di tali esoni (ognuno di ~3400 bp) ha reso, infatti, necessario disegnare più coppie di oligonucleotidi per riuscire a coprire tutte le regioni codificanti e fiancheggianti. Sono stati appositamente esclusi i primer che si appaiavano a zone di mutazioni, molto frequenti purtroppo nell'esone 11 di entrambi i geni. Gli esoni 11 di BRCA1 e BRCA2 sono stati “divisi” rispettivamente in 13 e in 16 tratti. Sempre a causa della loro lunghezza, anche altri esoni sono stati suddivisi in più tratti (l'esone 7 di BRCA1 diviso in due tratti e gli esoni 10, 14 e 27 di BRCA2 divisi rispettivamente in quattro, due e quattro tratti). Al contrario, essendo molto piccoli e vicini tra loro, è stata creata una sola coppia di primer per amplificare gli esoni 5 e 6 di BRCA2.

In totale, sono state disegnate 88 coppie di oligonucleotidi per l'amplificazione di BRCA1 e BRCA2 (tabelle 1a e 1b). La sintesi dei primer selezionati è stata effettuata dal servizio di sintesi oligo del CEINGE.

Tabella 1. a) Oligonucleotidi selezionati per l'amplificazione di BRCA1.

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₁ -1a	CCATCCTCTGATTGTACCTTGAT T	AGCTTCGGAAATCCACTCTC	306
B ₁ -1b	AGCTGACAGATGGGTATTCTTTG A	GCACCTCTTCTTCCACAAGGT	498
B ₁ -2	CGCCGAATGAAGTTGTCATTTTA TAAACCTTTT	GACATGTCTTTTCTTCCCTAGT ATGT	270
B ₁ -3	ACTCAGTCATAACAGCTCAAAGT T	CTTCTATAAAGTTAGGTGTTTC CT	247
B ₁ -4	CCACATTGTTCAAAGAGATAGAA TG	CATGTATAAAGGTTGTTAACTA AAC	442
B ₁ -5	CTTGTAATTCACCTGCCATTAC	GAATGGTTTTATAGGAACGCT ATG	313
B ₁ -6	GGTTTTCTACTGTTGCTGCATCT T	TTTTCATGGACAGCACTTGAG	256
B ₁ -7a	AACACAACAAAGAGCATACATAG G	AAGAAGAAGAAAACAAATGGT TTTAC	269
B ₁ -7b	CGCCCGCCGCTTTCCTTGAT TTTACAGATGC	CAGGAGGACTGCTTCTAGCC	279

Segue

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₁ -8	CCAGCCCCAGACATTTTAGT	CACTTCCCAAAGCTGCCTAC	394
B ₁ -9	CCTGCCACAGTAGATGCTCA	TGCACATACATCCCTGAACC	296
B ₁ -10	TTGGTCAGCTTCTGTAATCG	TCTACCCACTCTCTTTTCAGT	239
B ₁ -11a	ACCTCCAAGGTGTATGAAGTATGT	TTCCTTACTTCCAGCCCATCT	388
B ₁ -11b	GCATGAGAACAGCAGTTTATTAC	ATTTGGAGTGAAGTCTTTCAC TTT	500
B ₁ -11c	TGAGTGGTTTTCCAGAAGTGA	GGGTTAGGATTTTTCTCATTC TG	561
B ₁ -11d	GAGCGTCCCCTCACAAATAA	TGACTGGCATTGGTTGTACT	499
B ₁ -11e	CGCCCGCCGCTCAGTAGAAATCTA AGCCACCTAAT	CGCCCGCCGCATCTTTCAGT TTGCAAAACCCTTT	428
B ₁ -11f	CGCCCGCCGCAATGCACCTGGTTC TTTTACTAAGTG	CGCCGACTGACTCACACATTT ATTTGGTTCT	319
B ₁ -11g	TACCTGGTACTGATTATGGCACTCA G	TAGAGCCTCCTTTGATACTAC ATT	537
B ₁ -11h	GGAAATGCAGAAGAGGAATGTG	TCTCTAATGTTATTACGGCTA ATTGTG	473
B ₁ -11i	GCGGCTAGAGGAAAACCTTGAGGA ACATTCA	GCGGCTTCAGGATGCTTACA ATTACTTCCA	336
B ₁ -11j	TTCAAGCAGAACTAGGTAGAAACA GA	TTGCTAAAAACAGCAGAACTT TCCTT	334
B ₁ -11k	CGCCCGCCGCTTTGTTCTGAGACA CCTGATGACC	CGCCCGCCGCTTACCAAATA ACAAGTGTGGAAGC	285
B ₁ -11l	CATACACATTTGGCTCAGGGTTA	TGGAAGAACCAATCAAGAAA GGAT	382
B ₁ -11m	ATCACCTTAGTGAGGAAACAAAATG	TACTTGAAAATTTGTAAAATG TGCTC	346
B ₁ -12	GTAAATCCAGTCCTGCCAATG	GTCAGCAAACCTAAGAATGTG	273
B ₁ -13	GCGGGCGGCGTGGAAGCTTCTC AAAGTATTTTCAT	GCGGGCGGCGTGTTGGAGCT AGGTCCTTACTCTT	337
B ₁ -14	TGTCTGTTGCATTGCTTGTG	CTGGAGAAAGTATGGTGA AA	387
B ₁ -15	TTCACAATTGGTGGCGATG	TGTAGGATTCAGAGTAAAATC AAAGTGTT	294
B ₁ -16	CGCCCGCCGCTGTAATTCAACATT CATCGTTGTGTA	CGCCCGCCGCACAATACCTA CATAAACTCTTTCCAG	459
B ₁ -17	TCTGAGCTGTGTGCTAGAGGTAA	CCTCGCCTCATGTGGTTTTAT G	205
B ₁ -18	TGCTGGTTATAATTAGTGGTGTT	GGTGTAATAATGCAATTCTGA GG	314
B ₁ -19	AAAGAGCACGTTCTTCTGCTG	TGTGCATTGTTAAGGAAAGTG G	200

Segue

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₁ -20	TGTCTGCTCCACTTCCATTGAA	TCTTCCACTTATCAGCTAAGA TCT	428
B ₁ -21	CTAGATTTTCCTTCTCTCCATT C	GTAGAGAAATAGAATAGCCTC TA	242
B ₁ -22	GGGCCTGGGTAAAGTATGC	AGTCTTGCTCACAGGAGAGA AT	194
B ₁ -23	AGTCCTACTTTGACACTTTGAA TGC	CACCAGGTAATGAGTGATAAA CCAA	182
B ₁ -24	TCCTAAGAACTCATACAACCA G	AACAACAGCCTGAATAGAAA GA	557

Tabella 1. b) Oligonucleotidi selezionati per l'amplificazione di BRCA2.

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₂ -1	TTCGCCACACTGAGAAATACC	AGAGACAAAAGGGCAAGAA GC	409
B ₂ -2	CCAGGAGATGGGACTGAAT	GCAACACTGTGACGTACTG G	317
B ₂ -3	ATGCCTTAACAAAAGTAATCCAT	AGGCCAGAGAGACTGATTT G	497
B ₂ -4	AAACACTTCCAAAGAATGCAAAT	ATACAGAAAACCAGCCAATT CAA	409
B ₂ -5/6	AAAATAACCTAAGGGATTTGCTTTG	CTCAGGGCAAAGGTATAAC G	294
B ₂ -7	TCATACAGGCAATTCAGTAAACG	CAACCTCATCTGCTCTTCT TG	272
B ₂ -8	GTAGATGTGCTTTTTGATGTCTG	ACATATAGGACCAGGTTTA GAGAC	281
B ₂ -9	AAATCACCAAAAGTGAAACCA	AGAGCAAGACTCCACCTCA A	290
B ₂ -10a	TTCTATGAGAAAGGTTGTGAGAATA A	CAGTATCATTGGTTCCACT TCAGATA	378
B ₂ -10b	GCGGGCGGCGCAGTTGTAGATACC TCTGAAGAAGATAGT	GCGGCGGTACATGAAGAA ATATGCAA	384
B ₂ -10c	AAGGAAGTTGTACCGTCTTTGG	TATTAAACCTGCATTCTTCA AAGCTAC	588
B ₂ -10d	CTGAAAGTGGACTGGAAATACA	CATGTTTGAGTGACCTGATT C	483
B ₂ -11a	GATGGTACTTTAATTTTGCACTTTG	ACTAGGTTTGACAGAACAT CCTT	480
B ₂ -11b	GGAAGGACAGTGTGAAATGAT	GGATTGACAGTTATTTTGA AATTG	492
B ₂ -11c	TTATAAAACGTTGAGCTGTTGC	CTTCTTAATGTTATGTTGAG AGAGCTTGAT	598
B ₂ -11d	GA CTCTTAGGTCCAATTTCAAATCA	ATTCAAACTGACTTCCTGAT TCTTCTAATA	396
B ₂ -11e	GCGGCGATGTTATTTTCCAAGCAGG ATTTT	CGGGCGGGGCTTTTGTTAC AGTCATTTTCAACAGG	356
B ₂ -11f	TGAGGAATGCAGAGATGCTGA	CAGAATCATGACATTTACTT GAAGA	338
B ₂ -11g	TTTCTACTGAAGCTCTGCAAAAAG	CCCCGCCGTGAATACAAAC AGTATCATTTTACTTGAAT	372
B ₂ -11h	TGAAATGAAGATAACAAATATACT G	TCAGAATTTAAGGAAAAGTT ATGCAA	444
B ₂ -11i	TCAGACTGCAAGTGGGAAAAATA	GTGATTTCACTAGTACCTTG CT	387
B ₂ -11j	CTGAAAGAAAGTGTCACAGTT	GACTGAATAAGGGGACTGA TTT	519

Segue

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₂ -11k	GTAGACAACTGAAAATCTCAA ACA	GAGCTAGTCACAAGTTCC TCAA	589
B ₂ -11l	CAAAAATCATCTCTCCGAAAA	CCACTGGCTATCCTAAATG C	363
B ₂ -11l-bis	ATTTGCGTTGAGGAACTTGT	AACACTTGTCTTGCGTTTT G	578
B ₂ -11m	GAAAATTATGGCAGGTTGTTAC	TCCACTTGCTGTACTAAAT CCA	529
B ₂ -11n	CCAAGCAAGTCTTTTCCAAAGTA	CAGAAAAAGTTTCAGTTTT ACCAA	585
B ₂ -11o	AGGTGGTTCTTCAGAAAAATAATC A	AAACACTTTAAAAATAGTG ATTGGCAAC	478
B ₂ -12	GACTTTACTCTTTCAAACATTAG GTCAC	CGGAAGATCCGCATAACT CAG	560
B ₂ -13	TGCTGATTCTGTTGTATGCTTG	CATTTATAAAAACGAGACT TTTCTC	356
B ₂ -14a	AATAGTATCACCATGTAGCAAAT GAG	TTAGTTTTAAAAGGTGGAA CAAAGAC	335
B ₂ -14b	GCGGCAGTTTCAGGACATCCATT TTATCAAG	GCGGCGAAAACCATCAGG ACATTATTTAACA	399
B ₂ -15	CAGGGGTTGTGCTTTTAAATTT C	CCATTCCTGCACTAATGTG TTC	355
B ₂ -16	TTTGGTAAATTCAGTTTGGTTTG T	AGGGATGAGGGAATACAT AAAAGT	340
B ₂ -17	TGATCTTGAACAATGTAGTTTT G	GCTAGGGATGACAGGAGA AC	424
B ₂ -18	TCAGTTTTTATTCTCAGTTATTCA GTGAC	GTACATCTAAGAAATTGAG CATCCTT	561
B ₂ -19	GGCAGTTCTAGAAGAATGAAAAC	GCAAGAGACCGAAACTCC A	341
B ₂ -20	CCTGATACAATTAAGTTGAATGT T	AGTCTCTAAGACTTTGTTC TCATA	271
B ₂ -21	GGTGTTTTATGCTTGGTTCTTTA G	CATTTCAACATACTCCTTC CTGT	303
B ₂ -22	CAATAGATGGAACTTTTTGTTC G	GTAGTGGATTTTGCTTCTC TGATA	384
B ₂ -23	ATCACTTCTCCATTGCATCTTT	CAACATATGGAGATTCCAT AAACT	276
B ₂ -24	CAGTTTTGATAAGTGCTTGTTAG T	AGCTCCAACATAATCATAAG AGATT	290

Segue

Tratto	Sequenza oligonucleotidi		Lunghezza Amplicone (bp)
	Forward	Reverse	
B ₂ -25	CCTTTCTTGCATCTTAAAATTCATC T	ACTACCTCAACTATCCAAT TTGTAT	417
B ₂ -26	TGGGTTTGCAATTTATAAAGCAG	GATGGCCTCCATATATACT TCTTA	244
B ₂ -27a	ACTGTGTGTAATATTTGCGTGCTT	GGAGTCATCTGAGGAGAA TTCAGT	433
B ₂ -27b	AAAGAACTGCAAAAAGAGAAGAG C	ATAAACTGGAAAGGTTAAG CGTCA	523
B ₂ -27c	CGCCGTCTGATCAAAGAACAGGA GAGTTC	CGCCGCACCGAGCTCAGC CAAAG	363
B ₂ -27d	CCCCGCCGTTGCTTCAGTTGCAT ATCTTAAACT	CGCCGAAGGAGAACTATT TCATAGTGAGTTACC	421
B ₂ -28	CTATTCCAGTGTGATCTCTGAA	GGACGTAACAAATGAGAG TATCAT	270

2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Una tecnica basilare del lavoro sperimentale è stata la reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

Questo processo consiste nell'amplificazione specifica di una regione di DNA sfruttando l'azione di una DNA polimerasi termostabile su uno stampo di DNA in presenza di una coppia di oligonucleotidi che funzionano come iniziatori della reazione di sintesi, di quattro deossiribonucleotidi (dNTP), di un tampone di reazione ed infine del cloruro di magnesio (MgCl₂) che favorisce il legame degli oligonucleotidi al DNA genomico. Tale miscela viene sottoposta ciclicamente ad una fase di denaturazione del DNA stampo in singoli filamenti alla temperatura di 95°C, ad una fase di annealing del DNA con i primer ad una temperatura compresa tra 55°C e 65°C, infine ad una fase di elongazione del filamento copia alla temperatura di 72°C. Nel nostro laboratorio viene utilizzato il termociclatore "GeneAmp PCR System 2700" (Applied Biosystems- Foster City, CA, USA).

In particolare, per i tratti B₁-8, B₁-9, B₁-14, B₂-2, B₂-9, B₂-11I, B₂-11I-bis e B₂-17 sono stati utilizzati i reagenti, la miscela ed il programma di amplificazione illustrati nella tabella 2.

Tabella 2.

a) Reagenti e mix utilizzati per amplificare i tratti B₁-8, B₁-9, B₁-14, B₂-1, B₂-2, B₂-9, B₂-11I, B₂-11I-bis e B₂-17.

b) Programma di amplificazione su GeneAmp PCR System 2700.

a)

Reagenti	Volume (μl)
H ₂ O milliQ	23
Hot Master Mix (Eppendorf)	20
Primer F (20μM)	1,5
Primer R (20μM)	1,5
DNA genomico (50 ng/μl)	4

b)

Temperature	N° di Cicli
94° x 5'	1ciclo
94° x 30" 55° x 25" 72° x 30"	30cicli
72° x 7'	1ciclo
4°	

Per tutti gli altri tratti sono state utilizzate le condizioni descritte nella tabella 3.

Tabella 3. a) e b). Condizioni di PCR utilizzate per amplificare la maggior parte dei tratti di BRCA1 e BRCA2.

a)

REAGENTI	VOLUME (µl)
H ₂ O milliQ	23.16
DMSO (2,5%)	1
Buffer GC-Rich (Transgenomic)	4
dNTP (10mM) (Transgenomic)	3.2
Primer F (10 µM)	2
Primer R (10 µM)	2
Optimase® Polymerase (Transgenomic)	0.64
DNA genomico (10 ng/ µl)	4

b)

TEMPERATURE	N° DI CICLI
95° x 5'	1ciclo
95° x 30" 62° x 60" -0,5° /ciclo 72° x 65"	14cicli
95° x 5'	1ciclo
95° x 30" 55° x 60" 72° x 65"	25cicli
72° x 5'	1ciclo
4°	

Quindi per ottimizzare al massimo i tempi analitici, sono stati messi a punto per amplificare tutti gli 88 ampliconi, soltanto due protocolli e due programmi di PCR.

2.8. Elettroforesi su gel di agarosio

La specificità dell'amplificazione viene controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Sono stati utilizzati per lo più gel di agarosio al 2 % in TBE 1X (Tris borato 89 mM, pH 8.3, EDTA 0.2 mM).

Durante la preparazione del gel viene aggiunto anche il bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5 µg/ml, il quale, essendo un agente intercalante, si inserisce tra le basi del DNA che, in seguito all'esposizione del gel ad una luce U.V. a lunghezza d'onda di 260 nm, emette una fluorescenza arancio-rossa.

La lunghezza delle bande è dedotta confrontandole con un marcatore di peso molecolare noto, come il Marker XIV (100 bp step ladder, Roche Applied Science) (Figura 8).



Figura 8. Prodotti di PCR dell'esone 22 di BRCA2 caricati su gel di agarosio al 2%. Il size marker utilizzato è il Size Marker XIV (100 bp step ladder, Roche Applied Science).

2.9. Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

La DHPLC è una tecnica cromatografica molto versatile che si è molto sviluppata in questi ultimi anni. E' utilizzata per la ricerca di mutazioni non note (SNPs, piccole inserzioni e delezioni, STR) e per lo screening di mutazioni già note.⁷⁰

Riveste un ruolo fondamentale nel settore della diagnostica molecolare di numerose malattie genetiche e viene utilizzata anche in genetica forense e in farmacogenomica.⁷¹

Questa tecnica, applicata su frammenti di DNA di dimensioni di 100-600 bp, è molto sensibile (95%-97%), rapida (3-7 min/campione), poco laboriosa ed ha il vantaggio di essere totalmente automatizzata.^{72, 73}

Presso il CEINGE sono installati 4 WAVE® DNA Fragment Analysis System (modello 3500HT, Transgenomic, Omaha, NE, USA), che sono stati utilizzati per l'ottimizzazione della metodica di screening molecolare di BRCA1 e BRCA2 mediante DHPLC (Figura 9).



Figura 9. Immagine di un WAVE® System (Transgenomic) per analisi in DHPLC.

In particolare, la versatilità del WAVE® System è basata sull'opportunità di effettuare sullo stesso strumento diversi tipi di analisi, in base alle caratteristiche del campione che si ha a disposizione ed alla precisa applicazione che si richiede.

Infatti, il sistema consente di studiare:

- DNA a singolo filamento, oligonucleotidi ed RNA, utilizzando temperature comprese tra i 75°C e gli 80°C, quindi in condizioni di totale denaturazione della molecola di acido nucleico in analisi;
- Frammenti di DNA o ampliconi analizzati in base alla loro lunghezza, lavorando a temperatura di non denaturazione (~50°C);
- Molecole di acido nucleico in cui si intende ricercare la presenza di mutazioni puntiformi e/o piccole inserzioni – delezioni. Ciò è possibile applicando temperature di parziale denaturazione (*Temperatura di Melting*, T_m).

L'applicazione di *mutation detection* che prevede l'utilizzo delle T_m è basato sul principio della differente velocità di migrazione degli "eteroduplex" rispetto agli "omoduplex". Gli eteroduplex sono molecole ibride di DNA, formate da due catene complementari ma differenti per una singola base, tipiche di soggetti che presentano varianti geniche o mutazioni puntiformi in eterozigosi. Per ottimizzare i risultati del DHPLC e favorire la formazione degli eteroduplex, dopo la fase di PCR è prevista una denaturazione degli ampliconi a 95°C per 5', seguita da un successivo lento "re-annealing" a temperatura ambiente (Figura 10).

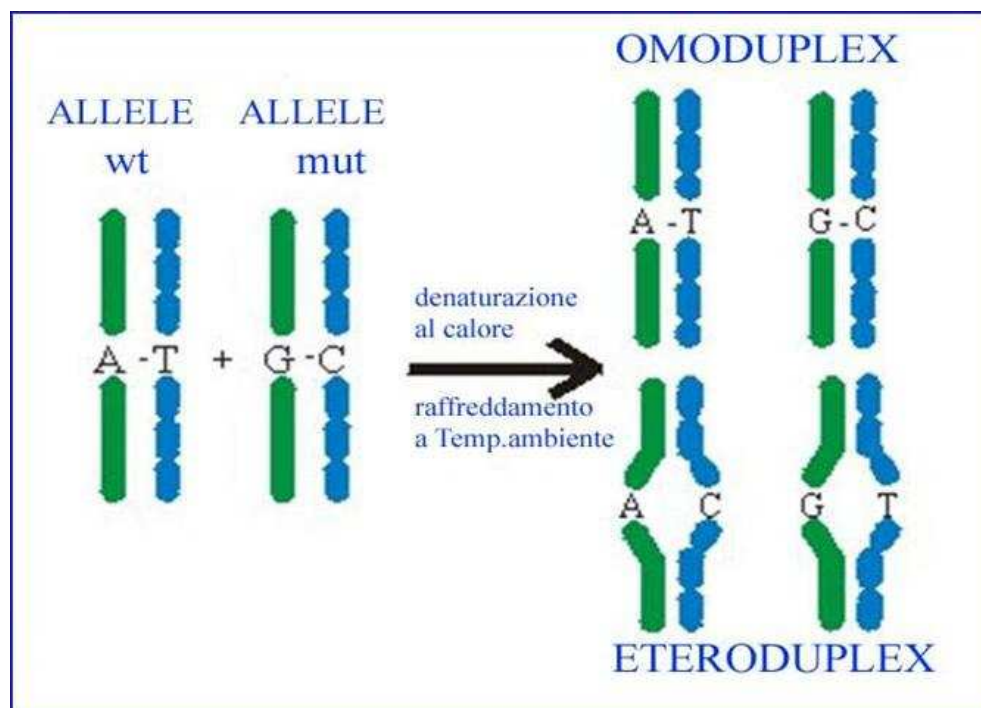


Figura 10. Formazione di molecole eteroduplex in seguito a denaturazione/raffreddamento.

In questo modo, le catene prodotte tendono ad appaiarsi casualmente, in parte costituiscono catene complementari wild type o mutate (omoduplex), in parte formano catene ibride (eteroduplex) caratterizzate dalla presenza di una "bolla" in cui è presente la mutazione. Proprio questa "bolla" costituisce la chiave di volta del sistema DHPLC: quando i frammenti di DNA eluiscono dalla colonna a temperatura di parziale denaturazione, la "bolla", ovvero la zona di non appaiamento, presenta una minore densità di gruppi fosfato e quindi una minore densità di carica rispetto al doppio filamento wild type. Questa caratteristica viene sfruttata per ottenere la separazione degli eteroduplex dagli omoduplex: gli eteroduplex, infatti, eluiscono dalla colonna prima degli omoduplex. L'ottimizzazione delle T_m risulta quindi uno step fondamentale, ai fini del riconoscimento delle molecole di eteroduplex e quindi dei campioni che presentano mutazioni in eterozigosi.

Risulta possibile ottimizzare le T_m per ciascun amplicone da analizzare, grazie all'utilizzo del "WAVEMAKER Utility Software" in dotazione al WAVE® System, dopo aver importato nel software stesso la sequenza e le caratteristiche del frammento da analizzare. Il WAVEMAKER, con un algoritmo, calcola la curva di denaturazione del frammento e suggerisce il profilo di gradiente dei tamponi da adottare per un'eluizione ottimale (Figura 11).

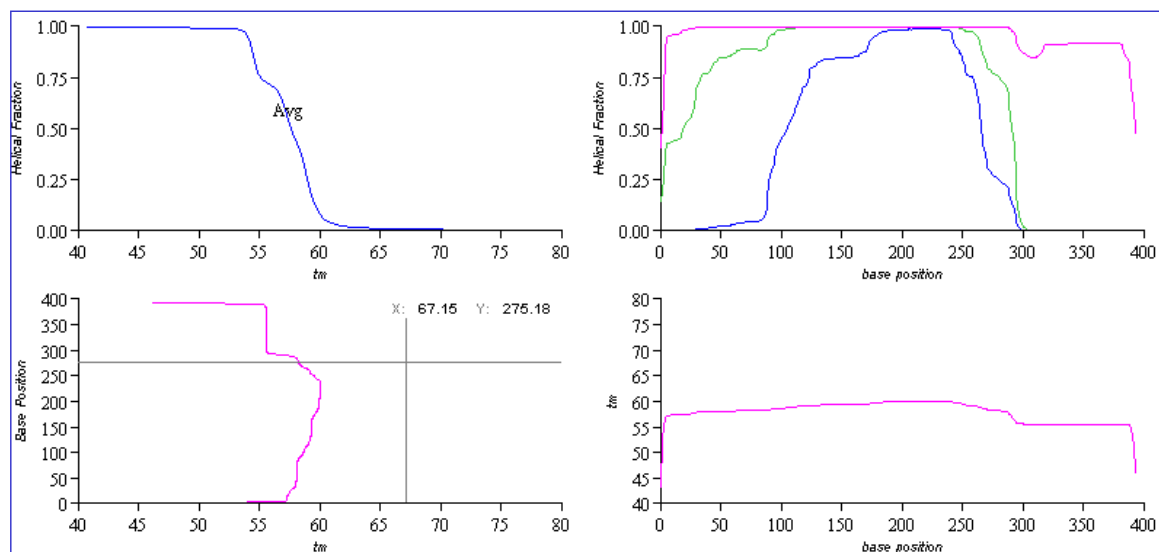


Figura 11. Curve di denaturazione calcolate dal WAVEMAKER Software per l'esone 8 di BRCA1.

I campioni di DNA da analizzare vengono iniettati nella colonna cromatografica (fase stazionaria) attraverso un flusso di tampone (fase liquida). La fase stazionaria è una matrice a fase inversa di polistirene-divinilbenzene, particolarmente resistente a variazioni di pH (2-13) e di temperatura (40°C-80°C).

La fase mobile è formata da TriEtilAmmonioAcetato (TEAA) 0,1 M e Acetonitrile (ACN) al 25% (tamponi A e B) che fluiscono nella colonna uno dopo l'altro grazie ad una pompa ad alta pressione. Il TEAA è costituito da una parte idrofobica, che interagisce con la matrice, e da una parte idrofilica che interagisce con le molecole di DNA da analizzare. L'applicazione del gradiente di ACN, la cui concentrazione dipende dalla lunghezza e dalla sequenza del frammento di DNA, comporta l'eluizione di quest'ultimo. Un lavaggio finale della colonna con una soluzione al 75% di ACN (tampone D) rimuove eventuali molecole di DNA ancora legate alla matrice, preparando la colonna all'analisi successiva. I diversi frammenti eluiti sono identificati da un rilevatore UV del sistema che converte il segnale analogico in un segnale digitale: il risultato è un cromatogramma con una serie di picchi corrispondenti ai frammenti di DNA. (Figura 12).

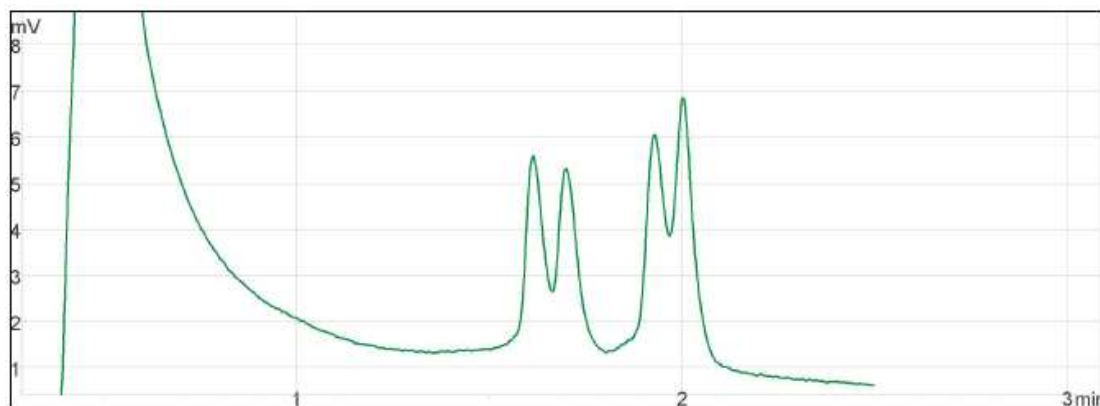


Figura 12. Cromatogramma di frammenti di DNA omoduplex-eteroduplex.

Inizialmente l'analisi di BRCA1 e BRCA2 mediante DHPLC, è stata ottimizzata basandosi sull'utilizzo delle T_m in modalità "Rapid DNA" (flusso dei tamponi pari a 1,5 ml/minuto) per ottenere corse cromatografiche più brevi, e quindi un risparmio di tempo e costi. Successivamente si è posta l'opportunità di ottimizzare di gran lunga questo step analitico. Infatti, in seguito a recenti studi bibliografici, è risultata emergente, ai fini di identificazione di mutazioni, una variante della tecnica DHPLC, che si basa sull'utilizzo di un' endonucleasi di origine vegetale, CEL I.⁷⁴

Quest'ultima è nota per la sua funzione di riconoscimento di *mismatch* in molecole di acido nucleico a doppio filamento, in corrispondenza del quale effettua un taglio enzimatico.^{75, 76} Questa endonucleasi, disponibile in forma commerciale come SURVEYOR® Nuclease (Transgenomic, Omaha, NE, USA), rende possibile l'analisi in DHPLC in modo ancora più facile e sensibile rispetto alla classica applicazione in

mutation detection. La metodologia combinata DHPLC/SURVEYOR® è basata sul metodo di *sizing* in condizioni non-denaturanti, piuttosto che sulle T_m .

In pratica, gli ampliconi sono analizzati in DHPLC alla temperatura di 45°C, e sono visualizzati, se wild type, con un singolo picco o, in presenza di mutazioni, con multipli picchi corrispondenti all'amplicone wild type non digerito dall'enzima e ai frammenti di amplicone con eteroduplex che derivano dal taglio enzimatico (Figura 13-14).

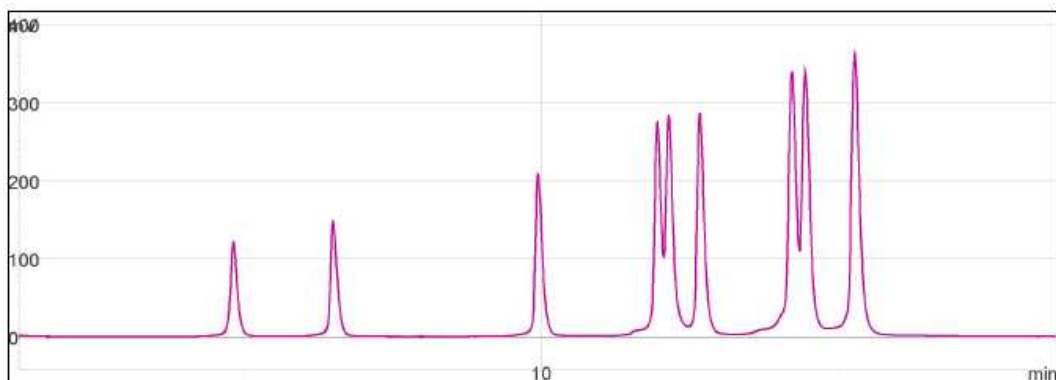


Figura 13. WAVE® DNA Sizing Standard (Transgenomic, Omaha, NE, USA).

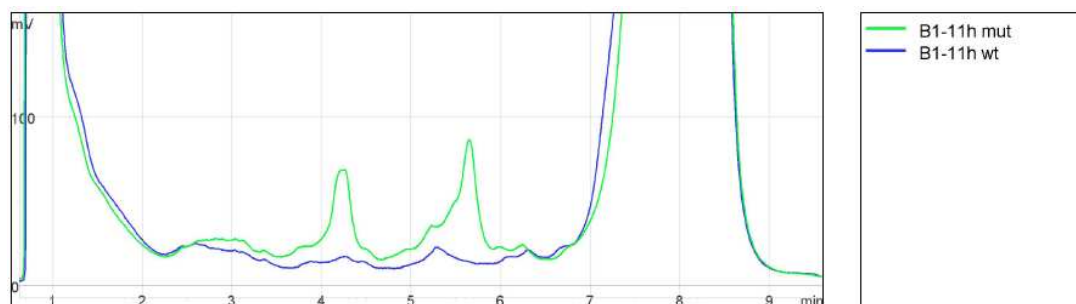


Figura 14. Un campione wild type ed un campione polimorfico analizzati per il tratto B1-11h con l'approccio DHPLC/SURVEYOR®.

La metodologia combinata DHPLC/SURVEYOR® è stata ottimizzata prima su singoli ampliconi, poi è stato ideato un protocollo che consentisse di analizzare più ampliconi simultaneamente, secondo un approccio “multiamplicon”.

In particolare, gli 88 ampliconi di BRCA1 e BRCA2 sono stati suddivisi in 17 gruppi, ciascun gruppo contenente massimo 5 ampliconi di dimensioni in bp simili (Tabella 4), ed in un gruppo di ampliconi che, essendo molto polimorfici, sono stati analizzati soltanto con le temperature di melting (Tabella 5).

Tabella 4. Schema dei gruppi multiamplicon per l'analisi in DHPLC/SURVEYOR®.

Gruppo	GRP1	GRP2	GRP3	GRP4	GRP5	GRP6
	B1e17	B1e3	B1e2	B1e12	B1e1	B1e5
	B1e19	B1e10	B1e6	B2e7	B1e15	B1e18
	B1e22	B1e21	B1e7A	B2e8	B2e5/6	
	B1e23	B2e26	B2e20	B2e23	B2e21	
			B2e28		B2e24	
Lunghezza media (bp)	195.3	243.0	267.2	275.5	297.4	317.3
St. Dev. (bp)	9.9	3.4	6.3	4.0	6.8	6.7

Gruppo	GRP7	GRP8	GRP9	GRP10	GRP11	GRP12
	B1e11J	B1e11M	B1e11L	B1e11A	B2e4	B1e4
	B2e11F	B2e13	B2e10A	B1e14	B2e25	B1e20
	B2e14A	B2e15	B2e22	B2e11D	B2e1	B2e11H
	B2e16			B2e11I		B2e27A
	B2e19					
Lunghezza media (bp)	337.5	352.3	378.5	390.3	413.0	436.8
St. Dev. (bp)	2.7	5.5	6.2	4.9	5.7	7.5

Gruppo	GRP13	GRP14	GRP15	GRP16	GRP17
	B1e11H	B1int1	B1e11G	B1e11C	B2e10C
	B2e11A	B1e11B	B2e11J	B1e24	B2e11C
	B2e11O	B1e11D	B2e11M	B2-12	B2e11K
		B2e11B	B2e27B	B2e18	B2e11N
Lunghezza media (bp)	478.5	497.6	527.0	557.2	590.0
St. Dev. (bp)	4.2	3.2	7.8	5.9	5.6

Tabella 5. Schema degli ampliconi che sono analizzati mediante T_m

AMPLICONE	LUNGHEZZA (BP)	TEMPERATURE DI MELTING (°C)
BRCA1		
B ₁ -8	394	53.9, 56.7, 58.3
B ₁ -9	296	53.2, 54.5
B ₁ -11e	388	56.7, 57.7
B ₁ -11f	319	57.3
B ₁ -11i	336	56.6, 57
B ₁ -11k	285	57.9, 59.6
B ₁ -13	337	59.1
B ₁ -16	459	56.9, 59.1
BRCA2		
B ₂ -2	317	54.7, 55.8, 56.7
B ₂ -9	290	54.5, 55.0, 56.2
B ₂ -10b	384	55.6, 57.9
B ₂ -11e	356	55.3, 57, 58.3
B ₂ -11g	372	53.8, 54.2
B ₂ -11l	363	53.0, 54.7, 55.1
B ₂ -11l-bis	578	54.6, 55.1
B ₂ -14b	399	55.6, 55.9
B ₂ -17	424	53.5, 56.6
B ₂ -27c	363	55.9
B ₂ -27d	421	53.9

Per i campioni che sono sottoposti all'analisi "multiamplicon" e quindi all'analisi DHPLC/SURVEYOR®, è stato ottimizzato un protocollo che prevede di miscelare in quantità equimolari i vari ampliconi di un gruppo per singolo campione, per un volume totale di 15 µl che fungono da substrato dell'enzima SURVEYOR®.

La digestione enzimatica avviene a 42°C per un'ora, alla fine della quale, dopo aver aggiunto la STOP Solution fornita dal kit, i campioni sono pronti per essere caricati e processati in DHPLC (Figura 15).

Sul WAVE® System sono stati ottimizzati ed impostati dei metodi specifici per ciascun gruppo di ampliconi, basandosi sulle dimensioni medie dei vari gruppi. L'*application type*, la temperatura ed il flusso di tamponi da scegliere sul software WAVE®, necessari per questo tipo di analisi sono rispettivamente "dsDNA multiple", 45°C e *flow rate* pari a 0.9 ml/minuto.

REAGENTI	VOLUME (µl)
MgCl ₂	1.5
Cofattore	1.5
SURVEYOR Enhancer	1
SURVEYOR Nucleasi	2
Mix di ampliconi	15



42°C x 60'



1.5 µl STOP Solution



Figura 15. Protocollo di digestione enzimatica con SURVEYOR®.

La rilevazione dei frammenti di DNA (ampliconi) che fluiscono attraverso il sistema cromatografico avviene mediante una lampada a xenon, che capta la fluorescenza emessa dai campioni in analisi. Per effettuare l'analisi in fluorescenza sul WAVE® System è stata utilizzata una soluzione fluorescente (WAVE® Optimized HS Staining Solution- Transgenomic, Omaha, NE, USA) che viene immessa nel sistema cromatografico tramite una pompa (modulo High Sensitivity Accessory, HSX). Abbiamo scelto l'utilizzo della fluorescenza per questo tipo di analisi, poichè la sensibilità analitica è notevolmente superiore alla rilevazione in UV (Figura 16).

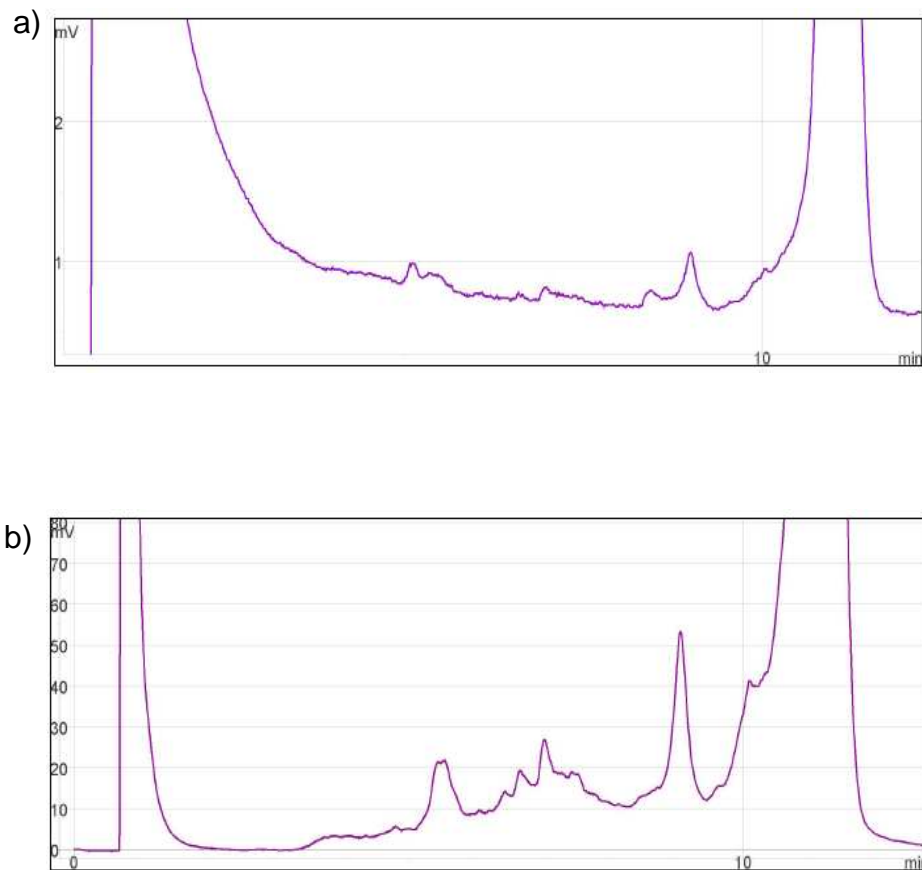


Figura 16. Campione mutato, analizzato in DHPLC sia con rilevazione UV (a) che con rilevazione in fluorescenza (b).

Inoltre, poiché la WAVE® Optimized HS Staining Solution funge da soluzione intercalante, non è necessario utilizzare oligonucleotidi fluorescenti per la PCR. Dall'analisi multiamplicon in DHPLC sono esclusi gli ampliconi B₁-7b, B₂-3 e B₂-10d, poiché sono caratterizzati dalla presenza di un polimorfismo in zona intronica presente in eterozigosi in tutti i soggetti di controllo analizzati, e risulterebbe inutilmente dispendioso effettuare anche una fase di screening pre-sequenziamento. Questi ampliconi quindi, subito dopo la fase di PCR, sono direttamente inviati al servizio di sequenziamento del CEINGE.

2.10. Sequenziamento diretto

Tutti i campioni che hanno mostrato un *pattern* di eluizione diverso da quello di un campione controllo, sono stati inviati al servizio di sequenziamento del CEINGE. Le sequenze sono state effettuate utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3 Risultati

Attualmente, sono stati amplificati ed analizzati in DHPLC/ SURVEYOR® con successo i 24 esoni di BRCA1 ed i 27 esoni di BRCA2 di 53 campioni di controllo, 15 pazienti già precedentemente analizzate presso l'Istituto Oncologico Giovanni Paolo II di Bari e 10 pazienti affette da carcinoma della mammella reclutate per il nostro studio presso l'Istituto Nazionale Tumori- Fondazione G. Pascale di Napoli ed il Dipartimento Universitario di Chirurgia Generale, Geriatrica, Oncologica e Tecnologie Avanzate della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Tutti i campioni che hanno presentato cromatogrammi compatibili con la presenza di variazioni di sequenza sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto, allo scopo di caratterizzare le varianti di sequenza identificate. In seguito all'analisi dei campioni che sono stati sequenziati, possiamo affermare che la metodica combinata DHPLC/SURVEYOR® si è rivelata estremamente sensibile, poiché è stata confermata la presenza di polimorfismi e mutazioni in tutti i campioni il cui cromatogramma risultava alterato. Anzi, la sensibilità totale della metodologia è addirittura aumentata, dal momento che utilizzando questa metodica di screening, è stato rilevato un polimorfismo nell'esone 13 di BRCA1, in un campione di controllo che, precedentemente analizzato con l'utilizzo delle T_m , era invece risultato wild type (Figura 17).

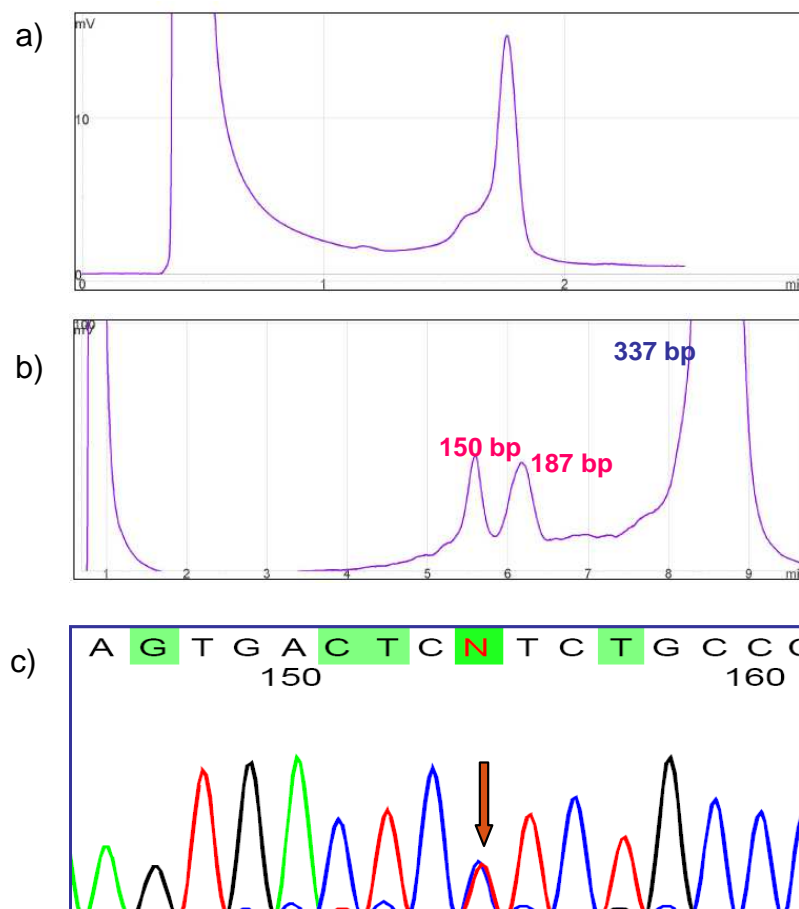


Figura 17. a) Cromatogramma di un campione analizzato per il tratto B1-13 mediante DHPLC con le T_m . b) Lo stesso campione della Figura 17 a), analizzato con la metodica DHPLC/SURVEYOR®. L'amplicone è lungo 337 bp. c) Tratto di sequenza del campione in cui è presente il polimorfismo c.4427T>C nell'esone 13 di BRCA1.

Nel complesso, lo screening sui campioni di controllo ha identificato 42 varianti geniche, di cui 19 in BRCA1 e 23 in BRCA2, tra cui 26 polimorfismi, 10 UCV e 6 nuove varianti, 3 introniche, una esonica, una in 5'UTR ed una in 3'UTR (Tabella 6).

Tabella 6. a) Varianti introniche identificate in BRCA1 e relative frequenze riscontrate nei 53 soggetti di controllo.

Varianti identificate	Regione genica	Frequenza Allelica (%) n.tot alleli= 106	Natura varianti
Varianti introniche BRCA1			
c.-1074C>G	5'UTR	25	UCV
c.-132T>C		20	Nuova
c.667-58delT	Introne 8	14	Polimorf.
c.4604-63C>G	Introne 14	19	UCV
c.5105+222A>G	Introne 16	23	Nuova
c.5106-92A>G		23.5	Polimorf.
c.5106-68A>G			
c.5193+65G>A	Introne 17	4	Nuova
c.5194-53C>T		7	UCV
c.5271+66G>A	Introne 18	11	Polimorf.

Tabella 6 b) Varianti esoniche identificate in BRCA1 e relative frequenze riscontrate nei 53 soggetti di controllo.

Varianti identificate	Regione genica	Frequenza Allelica (%) n.tot alleli= 106	Natura varianti
Varianti esoniche BRCA1			
c.1186A>G (p.Q356R)	Esone 11	6	Polimorf.
c.2201C>T (p.=) (p.S694S)		8	Polimorf.
c.2430T>C (p.=) (p.L771L)		9	Polimorf.
c.2196G>A (p.D693N)		8	Polimorf.
c.2731C>T (p.P871L)		11	Polimorf.
c.3232A>G (p.E1038G)		21	Polimorf.
c.3667A>G (p.K1183R)		8	Polimorf.
c.4427T>C (p=) (p.S1436S)	Esone 13	28	Polimorf.
c.4956A>G (p.S1613G)	Esone 16	0.9	Polimorf.

Tabella 6. c) Varianti introniche identificate in BRCA2 e relative frequenze riscontrate nei 53 soggetti di controllo.

Varianti identificate	Regione genica	Frequenza Allelica (%) n.tot alleli= 106	Natura varianti
Varianti introniche BRCA2			
c.-806A>G	5'UTR	15	UCV
c.-26G>A		16	Polimorf.
c.296-7delT	Introne 2	99	UCV
c.653+67 A>C	Introne 4	14	Polimorf.
c.909+56C>T	Introne 8	14	UCV
c.2137+12delT	Introne 10	100	UCV
c.7069+80del4(T TAA)	Introne 11	15	UCV
c.7663+53 C>T	Introne 14	15	Polimorf.
c.8033+25G>T	Introne 16	0.9	Nuova
c.8034-14T>C	Introne 16	22	Polimorf.
c.8983-66T>C	Introne 21	15	Polimorf.
c.9485-16 T>C	Introne 24	8	UCV
c.*105A>C	3'UTR	18	Nuova

Tabella 6. d) Varianti esoniche identificate in BRCA2 e relative frequenze riscontrate nei 53 soggetti di controllo.

Varianti identificate	Regione genica	Frequenza Allelica (%) n.tot alleli= 106	Natura varianti
Varianti esoniche BRCA2			
c.1342A>C (p.N372H)	Estone 10	25	Polimorf.
c.3027A>G (p.=) (p.T933T)	Estone 11	0.9	Nuova
c.3199A>G (p.N991D)		4	Polimorf.
c.3624A>G (p.=) (p.K1132K)		64	Polimorf.
c.4035T>C (p.=) (p.V1269V)		16	Polimorf.
c.5427 C>T (p.=) (p.S1733S)		5	Polimorf.
c.5972C>T (p.T1915M)		5	Polimorf.
c.7163A>T (p.D2312V)	Estone 12	5	UCV
c.7470 A>G (p.=) (p.S2414S)	Estone 14	9	Polimorf.
c.10204A>T (p.K3326X)	Estone 27	5	Polimorf.

Per le nuove varianti che sono state identificate sui 53 soggetti di controllo, è stata anche valutata la frequenza su una più ampia popolazione di controllo, i cui valori sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7. Nuove varianti identificate in BRCA1 e BRCA2 in una popolazione di controllo più ampia.

Varianti identificate		Regione genica	Frequenza Allelica (%) n.tot alleli= 400
BRCA1			
1	c.-132T>C	5'UTR	17.5
2	c.5105+222A>G	Introne 16	22
3	c.5193+65G>A	Introne 17	8
BRCA2			
4	c.3027A>G (p.=) (p.T933T)	Esone 11	0.03
5	c.8033+25G>T	Introne 16	0.03
6	c.*105A>C	3'UTR	17

Nelle 15 pazienti provenienti dall'Istituto Oncologico Giovanni Paolo II di Bari, in seguito allo screening dei geni BRCA1 e BRCA2, sono state identificate le 10 varianti di sequenza precedentemente rilevate ed illustrate in tabella 8.

Tabella 8. Varianti identificate nelle 15 pazienti di Bari.

Gene	Varianti identificate	Regione genica	N° pazienti	Natura varianti
BRCA1	p.Q356R	Esone 11	2	Polimorfismo
	p.P871L		2	Polimorfismo
	p.E1038G		2	Polimorfismo
	p.K1183R		1	Polimorfismo
	c.633delC	Esone 8	1	Mutazione
	c.5382insC	Esone 20	2	Mutazione
BRCA2	c.2150insTA	Esone11	1	Mutazione
	c.3034delAAAC		1	Mutazione
	p.T1915M		2	Polimorfismo
	p.N372H	Esone 10	1	Polimorfismo

È stato poi eseguito lo screening molecolare di BRCA1 e BRCA2 su 10 pazienti reclutate per questo studio con la collaborazione dell'Istituto Nazionale Tumori-Fondazione G. Pascale di Napoli ed il Dipartimento Universitario di Chirurgia Generale, Geriatrica, Oncologica e Tecnologie Avanzate della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Rispetto alle 4 categorie di pazienti previste dallo studio, le 10 reclutate erano così distribuite:

- ◆ una paziente con carcinoma mammario <40 anni;
- ◆ una paziente con HBOC;
- ◆ 8 pazienti con carcinoma mammario sporadico.

In seguito a tale screening è stata identificata una serie di polimorfismi ed UCV già noti in letteratura e, soprattutto, sono state rilevate una mutazione deleteria già nota,^{56, 61, 77} la p.K2013X nell'esone 11 di BRCA2, e un polimorfismo in omozigosi, p.P871L⁵⁶ nell'esone 11 di BRCA1, in una paziente che rientrava nella categoria di rischio *under-40* (Figure 18-19).

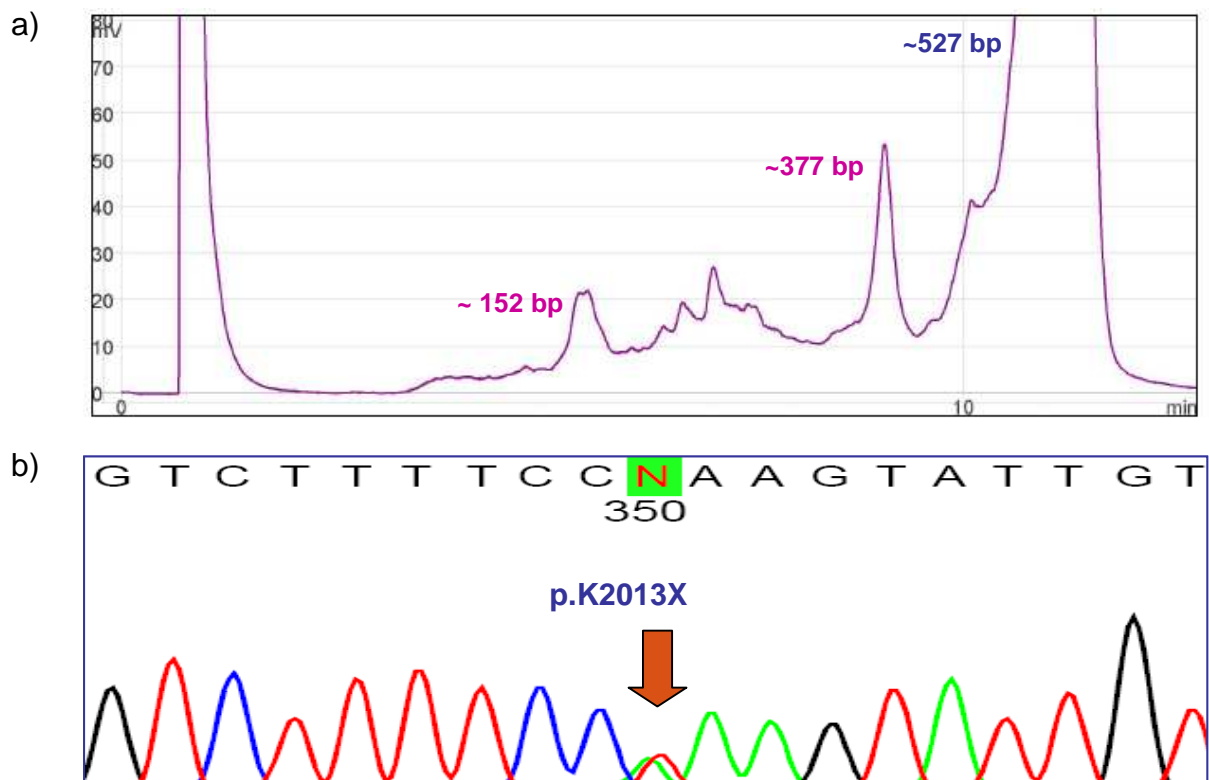


Figura 18. a) Cromatogramma del campione con mutazione deleteria. L'amplicone in analisi fa parte del gruppo 15 "multiamplicon". La lunghezza media degli ampliconi di questo gruppo è di 527 bp. Il taglio della nucleasi SURVEYOR® dovuto alla presenza della mutazione, produce un frammento lungo circa 152 bp ed un frammento di circa 377 bp, poiché l'amplicone in questione è lungo 529 bp. b) Sequenza del campione risultato alterato in cromatografia.

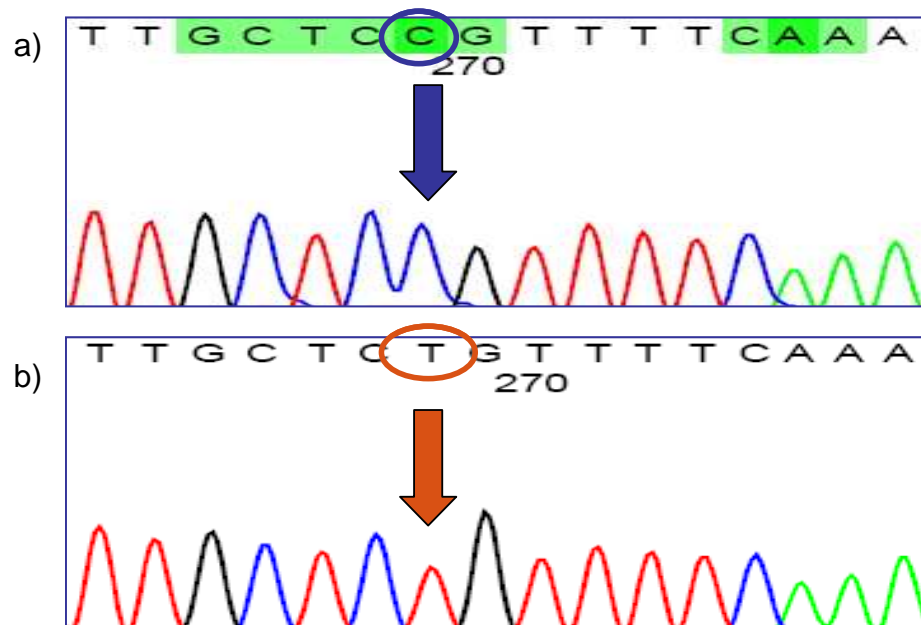


Figura 19. a) Sequenza di un campione wild type per il polimorfismo p.P871L in BRCA1. b) Sequenza del campione mutato (vedi figura 18) che presenta anche il polimorfismo p.P871L in omozigosi.

4 Discussione

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica rapida, poco costosa ma contemporaneamente sensibile e specifica, che permettesse l'identificazione di mutazioni nei geni di suscettibilità ai carcinomi della mammella BRCA1 e BRCA2. La scelta della strategia analitica per identificare mutazioni in BRCA1 e BRCA2 è stata presa tenendo in considerazione alcune caratteristiche fondamentali di questi due geni, tra cui soprattutto il fatto che entrambi i geni sono composti da un elevato numero di esoni (24 BRCA1 e 27 BRCA2) e che in uno qualsiasi di essi può essere rilevata una mutazione, poiché non esistono *hot spot*.

La metodica d'elezione per l'identificazione delle mutazioni è rappresentata dal sequenziamento diretto, tuttavia l'utilizzo di tale tecnica per analizzare gli 88 ampliconi di BRCA1 e BRCA2 sarebbe risultato alquanto dispendioso, sia in termini economici che di tempo, motivo per cui è stato deciso di adottare una tecnica di screening pre-sequenziamento. Tra le varie metodiche pubblicate in letteratura per lo screening molecolare di geni multiesonici, tra cui la SSCP, la CSGE e la DHPLC,^{61, 63, 67} quest'ultima sicuramente si distingue per l'elevata sensibilità (>95%), i brevi tempi di analisi e per i bassi costi.

Dopo aver ottimizzato le condizioni per l'amplificazione di BRCA1 e BRCA2, sono stati quindi analizzati 53 campioni di controllo dell'archivio di Fibrosi Cistica del CEINGE di Napoli, mediante DHPLC e successivo sequenziamento dei campioni che presentavano un profilo cromatografico alterato; sono stati così identificati numerosi polimorfismi ed UCV e 6 nuove varianti nei soggetti di controllo. L'utilizzo della metodica DHPLC basata sulle T_m è stato successivamente ridotto, per lasciare spazio ad un'ulteriore ottimizzazione di tutto l'iter analitico, creando un protocollo "multiamplicon" e sfruttando l'azione della nucleasi SURVEYOR®.^{74, 75, 76}

Questo nuovo protocollo analitico è stato quindi testato con i campioni di controllo, sia wild type che mutati. Tutti i campioni che, con la metodica precedente, erano risultati polimorfici alla DHPLC e confermati in sequenza, sono ugualmente risultati polimorfici con l'approccio multiamplicon/SURVEYOR®. Inoltre, l'esone 13 di BRCA1 di un campione di controllo che precedentemente era risultato wild type in DHPLC con le T_m , con la nuova metodica è risultato alterato. Il sequenziamento ha poi confermato la presenza di un polimorfismo.

La sensibilità derivante dalla combinazione del DHPLC e dell'enzima SURVEYOR®, risulta quindi maggiore rispetto alla metodica tradizionale che si basa sulle T_m .

Un altro dei vantaggi derivante dall'utilizzo della metodica SURVEYOR® combinata all'approccio "multiamplicon" consiste nel notevole risparmio di tempo richiesto per fare lo screening di tutti gli ampliconi di BRCA1 e BRCA2.

Infatti, con l'ottimizzazione basata sul SURVEYOR®, è stato stimato un tempo analitico per campione di circa 350 minuti, a differenza degli 875 minuti previsti dall'analisi mediante DHPLC classica. Inoltre, è stato stimato un modesto risparmio economico (~€100) rispetto all'utilizzo della classica metodica in DHPLC, ed un notevole risparmio (più di €1000) rispetto al sequenziamento diretto degli 88 ampliconi di BRCA1 e BRCA2.

A questo punto, è iniziata una vera e propria fase di reclutamento di pazienti con diagnosi clinica di HBOC e pazienti con carcinomi della mammella di tipo sporadico, da utilizzare come controlli per i nostri studi. A tal fine, sono state instaurate collaborazioni scientifiche con varie strutture cliniche, tra cui l'Istituto Oncologico

Giovanni Paolo II di Bari, l'Istituto Nazionale Tumori- Fondazione G. Pascale di Napoli ed il Dipartimento Universitario di Chirurgia Generale, Geriatrica, Oncologica e Tecnologie Avanzate della Facoltà di Medicina e Chirurgia della Università degli Studi di Napoli "Federico II". Attualmente sono stati analizzati con successo, con la metodica analitica ottimizzata presso il nostro centro di ricerca, 15 pazienti con HBOC di Bari e sono state rilevate 4 mutazioni note nel database BIC,⁵⁶ di cui una rilevata in 2 pazienti, e 6 polimorfismi,⁵⁶ di cui 4 rilevati in 2 pazienti. Lo screening effettuato sui campioni di DNA appartenenti alle pazienti reclutate nell'ambito della regione Campania ha rilevato la presenza nello stesso soggetto di una mutazione deleteria, la p.K2013X nell'esone 11 di BRCA2, e di un polimorfismo in omozigosi, p.P871L nell'esone 11 di BRCA2. La mutazione p.K2013X causa la creazione di un codone di stop, per cui ne risulta la produzione di una proteina tronca e non funzionale e la probabile soppressione di un sito di legame con la proteina Rad51, legame necessario per l'attività di ricombinazione omologa e riparazione dei danni al DNA.⁷⁸ Riguardo il polimorfismo p.P871L, alcuni studi recenti lo associano ad un aumentato rischio di sviluppare carcinoma della mammella, quando presente in omozigosi.⁷⁹ La presenza in contemporanea di una mutazione e di un polimorfismo di alto rischio nella stessa paziente può giustificare il fenotipo particolarmente aggressivo, caratterizzato da insorgenza del carcinoma in giovane età.

5 Conclusioni e prospettive

La diagnosi molecolare, in questo caso “diagnosi di suscettibilità” ai carcinomi della mammella e dell’ovaio, risulta di fondamentale importanza ai fini della prevenzione di tale patologia e sorveglianza clinica dei soggetti ad alto rischio.

Appare, quindi, chiaro come sia ugualmente importante la standardizzazione di procedure analitiche che consentano di ottenere delle risposte precise ed in tempi brevi, sull’assetto genetico del paziente che si sottopone all’indagine molecolare.

Presso i nostri laboratori, è stata messa a punto una metodica per l’identificazione di mutazioni in BRCA1 e BRCA2, i geni correlati ad alto rischio di sviluppare carcinomi della mammella e/o dell’ovaio. Tale metodica si è dimostrata altamente sensibile e specifica, e realizzabile in tempi più brevi ed a costi più limitati se paragonata al sequenziamento diretto. La fase di reclutamento sia per pazienti con diagnosi clinica di HBOC, sia per pazienti con carcinoma della mammella di tipo sporadico, è ancora in corso. Nonostante questi due geni siano quelli che conferiscono il più elevato rischio di sviluppare questa sindrome tumorale ereditaria, sono state riscontrate mutazioni su di essi soltanto nel 20% di tutti i casi di HBOC.

Per poter approfondire gli studi molecolari sul carcinoma della mammella e dell’ovaio, e riuscire eventualmente ad identificare altri geni che conferiscono suscettibilità ai suddetti tipi di carcinoma, abbiamo programmato di estendere l’analisi molecolare dei pazienti reclutati in questa fase progettuale, anche ad altri tipi di target molecolare, come ad esempio i microRNA ed il trascrittoma.

È ormai noto che i microRNA sono delle piccole molecole coinvolte, mediante meccanismi di regolazione della trascrizione, nei pathway di oncogenesi molecolare,^{27, 28, 29} e sono infatti presenti in letteratura numerosi studi effettuati proprio sulla alterazione di espressione di alcuni microRNA nei carcinomi della mammella.^{30, 31, 32, 33} Tuttavia, studi riguardanti i microRNA come molecole correlate ad aumentato rischio di sviluppare HBOC non sono stati effettuati, per cui risulta un campo di studio ancora inesplorato e per questo interessante ai fini della comprensione delle neoplasie eredo-familiari, quali i carcinomi della mammella e dell’ovaio.

6 Bibliografia

1. <http://www.tumori.net/it/>
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006" *Ann Oncol.* 2007; 18(3):581-92.
3. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. "Epidemiology of breast cancer" *Lancet Oncol.* 2001; 2(3):133-40.
4. Sieri S, Krogh V, Ferrari P, Berrino F, Pala V, Thiébaud AC, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Jakobsen MU, Clavel-Chapelon F, Chajes V, Boutron-Ruault MC, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Nöthlings U, Trichopoulou A, Naska A, Lagiou P, Panico S, Palli D, Vineis P, Tumino R, Lund E, Kumle M, Skeie G, González CA, Ardanaz E, Amiano P, Tormo MJ, Martínez-García C, Quirós JR, Berglund G, Gullberg B, Hallmans G, Lenner P, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Peeters PH, van Gils CH, Key TJ, Crowe FL, Bingham S, Khaw KT, Rinaldi S, Slimani N, Jenab M, Norat T, Riboli E. "Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition" *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(5):1304-12.
5. Cady B. "Familial bilateral cancer of the breast" *Ann Surg.* 1970; 172: 264-72.
6. Fraumeni JF, Grundy GW, Creagan ET, Everson RB. "Six families prone to ovarian cancer" *Cancer* 1975; 36:364-69.
7. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1" *Science* 1994; 266(5182): 66-71.
8. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. "Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2." *Nature.* 1995; 378(6559): 789-92.
9. Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, Petroni S, Schittulli F, Longo S, Digennaro M, Calistri D, Mangia A, Paradiso A. "BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy" *Mutat Res.* 2005; 578(1-2): 395-405.
10. Giannini G, Capalbo C, Ristori E, Ricevuto E, Sidoni T, Buffone A, Cortesi E, Marchetti P, Scambia G, Tomao S, Rinaldi C, Zani M, Ferraro S, Frati L, Screpanti I, Gulino A. "Novel BRCA1 and BRCA2 germline mutations and assessment of mutation spectrum and prevalence in Italian breast and/or ovarian cancer families" *Breast Cancer Res Treat.* 2006; 100(1): 83-91.
11. <http://www.myriadtests.com/>
12. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. "Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers" *Natl Cancer Inst.* 2007; 99(23):1811-4.
13. Mohamad HB, Apffelstaedt JP. "Counseling for male BRCA mutation carriers: a review" *Breast* 2008; 17(5):441-50.

14. Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID. "BRCA1 gene in breast cancer" *J Cell Physiol.* 2003; 196(1): 19-41.
15. Thompson D, Easton DF; Breast Cancer Linkage Consortium. "Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers" *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(18): 1358-65.
16. Mai PL, Chatterjee N, Hartge P, Tucker M, Brody L, Struewing JP, Wacholder S. "Potential excess mortality in BRCA1/2 mutation carriers beyond breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancers, and melanoma" *PLoS One* 2009; 4(3): e4812.
17. Turnbull C, Rahman N. "Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future" *Annu Rev Genom Human Genet.* 2008; 9: 321-45.
18. Chen X, Truong TT, Weaver J, Bove BA, Cattie K, Armstrong BA, Daly MB, Godwin AK. "Intronic alterations in BRCA1 and BRCA2: effect on mRNA splicing fidelity and expression" *Hum Mutat.* 2006; 27(5): 427-35.
19. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC. "Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer" *JAMA* 2006; 295(12): 1379-88.
20. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. "Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues" *Hum Genet.* 2008; 124: 31–42.
21. Hsu HM, Wang HC, Chen ST, Hsu GC, Shen CY, Yu JC. "Breast Cancer Risk Is Associated with the Genes Encoding the DNA Double-Strand Break Repair Mre11/Rad50/Nbs1 Complex" *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(10)
22. McInerney NM, Miller N, Rowan A, Colleran G, Barclay E, Curran C, Kerin MJ, Tomlinson IP, Sawyer E. "Evaluation of variants in the CHEK2, BRIP1 and PALB2 genes in an Irish breast cancer cohort" *Breast Cancer Res Treat.* 2009
23. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. "CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls" *J Clin Oncol.* 2008; 26(4): 542-8.
24. Papi L, Putignano AL, Congregati C, Piaceri I, Zanna I, Sera F, Morrone D, Genuardi M, Palli D. "A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy" *Fam Cancer.* 2009 Sep 18.
25. MacPherson G, Healey CS, Teare MD, Balasubramanian SP, Reed MW, Pharoah PD, Ponder BA, Meuth M, Bhattacharyya NP, Cox A. "Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer" *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(24): 1866-9.
26. Sergentanis TN, Economopoulos KP. "Association of two CASP8 polymorphisms with breast cancer risk: a meta-analysis" *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jul 24.
27. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors" *Dev Biol.* 2007; 302(1):1-12.
28. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer" *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(4): 259-69.
29. Wu W, Sun M, Zou GM, Chen J. "MicroRNA and cancer: Current status and prospective" *Int J Cancer.* 2007; 120(5): 953-60.

30. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. "Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer" *Nature* 2007; 449(7163): 682-8.
31. Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. "Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis" *Nature* 2008; 451(7175): 147-52.
32. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY. "MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis" *RNA* 2008; 14(11): 2348-60.
33. Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, Ménard S, Croce CM. "MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer" *Eur J Cancer*. 2008; 44(18): 2753-9.
34. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product" *Nat Genet*. 1996; 14(4): 430-40.
35. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(20): 11364-9.
36. Morris JR, Solomon E. "BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair" *Hum Mol Genet*. 2004; 13(8): 807-17.
37. Zhong Q, Chen CF, Li S, Chen Y, Wang CC, Xiao J, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. "Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response" *Science* 1999; 285(5428): 747-50.
38. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. "BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures" *Genes Dev*. 2000; 14(8): 927-39.
39. Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS. "The BRCA1 C-terminal domain: structure and function" *Mutat Res*. 2000; 460(3-4): 319-32.
40. Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. "BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity" *Oncogene* 1998; 16(13): 1713-21.
41. Yarden RI, Brody LC. "BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(9): 4983-8.
42. Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. "BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(11): 5605-10.
43. Simons AM, Horwitz AA, Starita LM, Griffin K, Williams RS, Glover JN, Parvin JD. "BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1" *Cancer Res*. 2006; 66(4): 2012-8.
44. Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. "Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin" *Science* 2001; 293(5535): 1651-3.
45. Starita LM, Parvin JD. "The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair" *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15(3): 345-50.
46. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Mitchell JT,

- McArthur-Morrison J, Nguyen K, Peng Y, Samson C, Schroeder M, Snyder SC, Steele L, Stringfellow M, Stroup C, Swedlund B, Swense J, Teng D, Thomas A, Tran T, Tranchant M, Weaver-Feldhaus J, Wong AK, Shizuya H, Eyfjord JE, Cannon-Albright L, Tranchant M, Labrie F, Skolnick MH, Weber B, Kamb A, Goldgar DE. "The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds" *Nat Genet.* 1996; 12(3): 333-7.
47. Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR. "Involvement of Brca2 in DNA repair" *Mol Cell.* 1998; 1(3): 347-57.
 48. Milner J, Ponder B, Hughes-Davies L, Seltsmann M, Kouzarides T. "Transcriptional activation functions in BRCA2" *Nature* 1997; 386(6627): 772-3.
 49. Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R. "The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins" *Hum Mol Genet.* 1997; 6(1): 53-8.
 50. Warren M, Smith A, Partridge N, Masabanda J, Griffin D, Ashworth A. "Structural analysis of the chicken BRCA2 gene facilitates identification of functional domains and disease causing mutations" *Hum Mol Genet.* 2002; 11(7): 841-51.
 51. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR. "Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex" *Nature* 2002; 420(6913): 287-93.
 52. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, Liu X, Jasin M, Couch FJ, Livingston DM. "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2" *Mol Cell.* 2006; 22(6): 719-29.
 53. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. "Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2" *EMBO Rep.* 2009; 10(9): 990-6.
 54. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. "PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2" *Mol Cancer Res.* 2009; 7(7): 1110-8.
 55. Sy SM, Huen MS, Chen J. "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(17): 7155-60.
 56. <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
 57. Phelan CM, Dapic V, Tice B, Favis R, Kwan E, Barany F, Manoukian S, Radice P, van der Luijt RB, van Nesselrooij BP, Chenevix-Trench G, kConFab, Caldes T, de la Hoya M, Lindquist S, Tavtigian SV, Goldgar D, Borg A, Narod SA, Monteiro AN. "Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance" *J Med Genet.* 2005; 42(2): 138-46.
 58. Ferla R, Calò V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carrega I, Surmacz E, Colucci G, Bazan V, Russo A. "Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes" *Ann Oncol.* 2007 Jun;18 Suppl 6:vi93-8.
 59. Papi L, Putignano AL, Congregati C, Zanna I, Sera F, Morrone D, Falchetti M, Turco MR, Ottini L, Palli D, Genuardi M. "Founder mutations account for the majority of BRCA1-attributable hereditary breast/ovarian cancer cases in a population from Tuscany, Central Italy" *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 117(3): 497-504.
 60. Russo A, Calò V, Augello C, Bruno L, Agnese V, Schirò V, Barbera F, Cascio S, Foddai E, Badalamenti G, Intrivici C, Cajozzo M, Gulotta G, Surmacz E,

- Colucci G, Gebbia N, Bazan V. "4843delC of the BRCA1 gene is a possible founder mutation in Southern Italy (Sicily)" *Ann Oncol*. 2007; 18 Suppl 6:vi99-102.
61. Hamann U, Liu X, Lange S, Ulmer HU, Benner A, Scott RJ. "Contribution of BRCA2 germline mutations to hereditary breast/ovarian cancer in Germany" *J Med Genet*. 2002; 39(3): E12.
 62. Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, Tawil M, Torregrosa L, Briceno I, Hamann U. "High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia" *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 103(2): 225-32.
 63. Kumar BV, Lakhota S, Ankathil R, Madhavan J, Jayaprakash PG, Nair MK, Somasundaram K. "Germline BRCA1 mutation analysis in Indian breast/ovarian cancer families" *Cancer Biol Ther*. 2002; 1(1): 18-21.
 64. Balci A, Huusko P, Pääkkönen K, Launonen V, Uner A, Ekmekçi A, Winqvist R. "Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in Turkish cancer families: a novel mutation BRCA2 3414del4 found in male breast cancer" *Eur J Cancer*. 1999 May;35(5):707-10.
 65. Agata S, Dalla Palma M, Callegaro M, Scaini MC, Menin C, Ghiotto C, Nicoletto O, Zavagno G, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E, Montagna M. "Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families" *J Med Genet*. 2005; 42(10): e64.
 66. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijdt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G. "Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method" *Cancer Res*. 2003; 63(7): 1449-53.
 67. Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pagès S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, Oefner P. "Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations" *Genomics* 1999; 62(3): 369-76.
 68. Eng C, Brody LC, Wagner TM, Devilee P, Vijg J, Szabo C, Tavtigian SV, Nathanson KL, Ostrander E, Frank TS; Steering Committee of the Breast Cancer Information Core (BIC) Consortium. "Interpreting epidemiological research: blinded comparison of methods used to estimate the prevalence of inherited mutations in BRCA1" *J Med Genet*. 2001; 38(12): 824-33.
 69. Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B, Gadzicki D. "Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review" *Eur J Hum Genet*. 2007; 15(6): 619-27.
 70. Liu W, Smith DI, Rechtzigel KJ, Thibodeau SN, James CD. "Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations" *Nucleic Acid Res*. 1998; 26(6):1396-400.
 71. Frueh FW, Noyer-Weidner M. "The use of Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impacts for diagnosis and pharmacogenetics" *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41(4): 452-61.
 72. Xiao W, Oefner PJ. "Denaturing High Performance Liquid Chromatography: a review" *Hum Mut*. 2001; 17: 439-74.

73. Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. "A comparison of fluorescent SSCP and Denaturing HPLC for high throughput mutation scanning" *Hum Mut.* 2000; 15: 556-64.
74. Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, Besack D, Yeung JA, Kowalski D, Yeung AT. "Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease" *Biochemistry* 2000; 39(13): 3533-41.
75. Janne PA, Borrás AM, Kuang Y, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H, Lindeman N, Lee JC, Halmos B, Maher EA, Distel RJ, Meyerson M, Johnson BE. "A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening" *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 751-58.
76. Tan YC, Blumenfeld JD, Anghel R, Donahue S, Belenkaya R, Balina M, Parker T, Levine D, Leonard DG, Rennert H. "Novel method for genomic analysis of PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease" *Hum Mutat.* 2009; 30(2): 264-73.
77. Wappenschmidt B, Fimmers R, Rhiem K, Brosig M, Wardelmann E, Meindl A, Arnold N, Mallmann P, Schmutzler RK. "Strong evidence that the common variant S384F in BRCA2 has no pathogenic relevance in hereditary breast cancer" *Breast Cancer Res.* 2005; 7(5): R775-9.
78. Watson P, Lieberman R, Snyder C, Clark VJ, Lynch HT, Holt JT. "Detecting BRCA2 protein truncation in tissue biopsies to identify breast cancers that arise in BRCA2 gene mutation carriers" *J Clin Oncol.* 2009; 27(24): 3894-900.

Appendice

Rapid screening by Surveyor Nuclease-based mutation detection for BRCA1 and BRCA2 genes

B. Pilato^{1*}, M. Iorio^{2*}, M. Martinucci¹, S. Papadimitriou³, P. Zaccagna³, F. Salvatore², A. Paradiso¹, G. Frisso², S. Tommasi¹

¹National Cancer Institute “Giovanni Paolo II” Bari, Italy; ²CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl & Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli; ³Transgenomic Limited, Glasgow, UK; *These two authors contributed equally to the paper

Twenty-three percent of first diagnosed breast cancer patients with characteristics of familiarity are candidates for BRCA genetic test and BRCA1 and BRCA2 mutations occur in almost 20% of this group of patients. BRCA testing is complicated by the large size of the two genes and the wide variation of mutations. The preferred method to evaluate BRCA for known and unknown alterations is prescreening by dHPLC plus sequencing of positive amplicons even if other approaches (i.e. chip-based) have been set-up.

Our aim was to establish a WAVE®-HS System-based methodology to perform BRCA1/BRCA2 analysis with Surveyor Nuclease enzyme using a Multi-Amplicon approach in order to reduce the overall time and costs needed to screen the genes.

Fifteen patients and 30 controls with previously characterized BRCA mutations were used for blind analysis by the new approach. DNA fragments including exons 8, 11, 20 and 24 of BRCA1 and 4,10, 11, 12, 17, 18, 25 and 27 of BRCA2 were amplified by PCR using DNA samples extracted from blood. Denaturation followed by gradual annealing of the amplified fragments forms heteroduplexes at the site of base-pair mismatches if a mutation is present because DNA samples will also contain wild-type DNA derived by non malignant cells. After cleavage by Surveyor nuclease, a new specific endonuclease that cleaves heteroduplex DNA at a base-mismatch site in both DNA strands, mutations were simply detected by dHPLC WAVE Nucleic Acid High Sensitivity Fragment Analysis System (Transgenomic) followed by sequencing of variant gene amplicons.

Presently, only 3 amplicons can be simultaneously analyzed with a sensitivity and specificity of 100% for both pathological samples and healthy controls. We also showed that this enzyme does not show any significant preference for cleavage at different types of mismatch.

In conclusion, the Surveyor Nuclease method, used with a multi-amplicon approach, was comparable to direct sequencing for detecting BRCA mutations, achieving high sensitivity with lower cost and a saving in time, providing an important tool for genetic analysis of complex genes.